



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS DE
AVES MIGRATÓRIAS NO LITORAL PARAIBANO**

Cristiane Ribeiro da Silva

Areia-PB
Março/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS DE
AVES MIGRATÓRIAS NO LITORAL PARAIBANO**

Cristiane Ribeiro da Silva

Orientador: Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp

Coorientador: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Areia-PB

Março/2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586r Silva, Cristiane Ribeiro da.

Resistência Antimicrobiana de Enterobactérias de Aves
Migratórias no Litoral Paraibano / Cristiane Ribeiro da
Silva. - Areia, 2019.

77 f. : il.

Coorientação: Celso José Bruno de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Enterobacteriaceae. 2. Migração. 3. Aves limícolas.
4. Resistência Bacteriana. I. Título

UFPB/CCA-AREIA

CRISTIANE RIBEIRO DA SILVA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS DE
AVES MIGRATÓRIAS NO LITORAL PARAIBANO.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal do Brejo
Paraibano.

APROVADA EM 11/07/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. CELSO JOSÉ BRUNO DE OLIVEIRA
DZ/CCA/UFPB
Coordenador

Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO
UFMG
Examinador

Dra. PATRÍCIA EMÍLIA NAVES GIVISIEZ
DZ/CCA/UFPB
Examinadora

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CRISTIANE RIBEIRO DA SILVA – Ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba no Centro de Ciências Agrárias-Campus II- Areia no de 2006. Foi bolsista de monitoria na disciplina de Biologia Molecular entre 2009-2010 diplomando-se no ano de 2010. No ano de 2012 ingressou para o curso de Especialização em Gestão e Avaliação da Educação Superior pela Universidade Federal da Paraíba recebendo o título de especialista no de 2013. No ano de 2016 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba sob a orientação do Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

Primeiramente ao Deus, por toda graça e sabedoria que me concedeu;
Aos meus pais Maria do Socorro Ribeiro da Silva e Cosmo da Silva Ribeiro que
sempre oraram por mim e me incentivaram a não desistir desta caminhada;
Aos meus irmãos Luiz Antônio Ribeiro da Silva e Lidianne Ribeiro da Silva também
por toda oração feita e apoio;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Deus maravilhoso que está sempre presente em minha vida, me encorajando e cuidando de mim, pelas as oportunidades e vitórias concedidas por Ele.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal da Paraíba, por me conceder a oportunidade de aumentar meu conhecimento.

Aos professores Danilo Tancler Stipp e Celso José Bruno de Oliveira pela orientação, ensinamentos e confiança em mim. Ao professor Celso por ter me acolhido em seu laboratório.

Ao secretário Jozênio Souza do Programa de Pós-graduação por todo apoio e atenção a mim dispensado.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, por sempre colaborarem comigo, em especial a Vânia e Luana que me ajudaram muito me repassando seus conhecimentos sempre com carinho e atenção, como também a Diogo por toda ajuda e incentivo.

Aos meus colegas de trabalho do CAMOPS/UFPB, Andréia, Socorro, Maria José, Luiz Felipe, Rociane, Elinalda, Tércia, Liana e Tatianna, que tanto me ajudaram e compreenderam nos momentos mais difíceis durante toda essa jornada.

A todos que fazem parte do LAPOA (Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal) da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia-PB.

Deixo um agradecimento em especial a duas pessoas que Deus colocou em minha vida, Rafaela e Priscylla por me ajudarem nesta minha caminhada, me apoiando, me repassando seus conhecimentos com tanta dedicação. Obrigada por estar comigo em tantos finais de semanas e feriados trabalhando. Deus abençoe vocês!

Obrigada a todos que de alguma forma torceram por mim!

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1. Relação das espécies de Charidriiformes e Scolopacidae (maçaricos)..... | 58 |
| Tabela 2. Valores de halos inibitórios esperados para Enterobacteriaceae..... | 60 |
| Tabela 3. Detalhes dos <i>primers</i> utilizados e as condições de termociclagem..... | 63 |
| Tabela 4. Agentes bacterianos isolados em amostras de <i>swabs</i> cloacais de espécies de maçaricos na Ilha da Restinga em Cabelo na Paraíba..... | 65 |
| Tabela 5. Frequência absoluta do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos apresentados pelas cepas isoladas..... | 66 |
| Tabela 6. Cepas positivas para o teste fenotípico com possível confirmação de produção de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) de acordo com o gênero e a presença de halo fantasma para cada antimicrobiano usado..... | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Principais rotas migratórias que interligam as Américas do Norte, Central e do Sul..... | 20 |
| Figura 2. Anel Betalactâmico..... | 32 |
| Figura 3. Princípios da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo..... | 40 |
| Figura 4. Localização da área de estudo na Paraíba..... | 56 |
| Figura 5. Rede de neblina montada no local de captura das aves..... | 57 |
| Figura 6. Coleta com <i>swab</i> | 58 |
| Figura 7. Teste de aproximação de discos para detecção de ESBL..... | 61 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | Página |
|--|--------|
| Gráfico 1. Resultado geral do exame microbiológico de swabs cloacais das aves capturadas considerando ausência ou presença de crescimento de microrganismo no total de 71 amostras - Paraíba- 2018..... | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------|---|
| AMC | Amoxicilina/ácido clavulânico |
| AMP | Ampicilina |
| ATM | Aztreonam |
| B | Beta |
| CTX | Cefotaxima |
| CIP | Ciprofloxacina |
| CFO | Cefoxitina |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards |
| CAZ | Ceftazidima |
| °C | Celsius |
| ESBL | Beta-lactamase de espectro estendido |
| EDTA | Ácido etilenoaminotetracético |
| GEN | Gentamicina |
| H₂S | Sulfeto de Hidrogênio |
| ICMBio | Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade |
| IPM | Imipenem |
| µg | Micrograma |

| | |
|------------------------|--|
| µl | Microlitro |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de Polimerase) |
| PBP_s | Proteínas ligadoras de penicilina |
| RDC | Resolução da Diretoria do Colegiado |
| SIM | Sulfeto/ Indol/ Mobilidade |
| SUT | Sulfametoxazol/trimetropina |
| TET | Tetraciclina |
| TSA | Teste de suscetibilidade a antimicrobianos |
| TSI | Triple sugar iron |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO GERAL | 15 |
| ABSTRACT | 16 |
| INTRODUÇÃO | 17 |
| FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 19 |
| Aves Migratórias no Continente Americano..... | 19 |
| Famílias Charadriidae e Scolopacidae..... | 21 |
| Família Enterobacteriaceae..... | 22 |
| Gênero <i>Escherichia</i> | 23 |
| Gênero <i>Klebsiella</i> | 23 |
| Gênero <i>Pseudomonas</i> | 24 |
| Gênero <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 25 |
| Gênero <i>Salmonella</i> | 26 |
| Gênero <i>Providencia rettgeri</i> | 27 |
| Gênero <i>Acinetobacter parvus</i> | 28 |
| Gênero <i>Enterobacter asburiae</i> | 29 |
| Resistência aos antimicrobianos..... | 30 |
| Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos..... | 32 |
| Classificação das β -lactamases..... | 33 |
| β -lactamase de espectro ampliado ESBL..... | 34 |
| β -lactamases AmpC..... | 37 |
| Carbapenemases..... | 38 |
| MALDI-TOF MS..... | 39 |
| REFERÊNCIAS | 41 |
| CAPÍTULO I- Resistência Antimicrobiana de Enterobactérias de Aves Migratórias no Litoral Paraibano | 52 |
| ABSTRACT | 53 |
| INTRODUÇÃO | 54 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 56 |
| Área de Estudo..... | 56 |
| Captura as Aves..... | 56 |
| Coleta as Amostras..... | 57 |
| Processamento das Amostras..... | 59 |
| Isolamento e Identificação Fenotípica..... | 59 |
| Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana <i>in vitro</i> | 59 |
| Identificação por MALDI-TOF..... | 61 |
| Identificação dos Mecanismos de Resistência por PCR..... | 61 |
| RESULTADOS | 64 |
| DISCUSSÃO | 70 |
| CONCLUSÕES | 73 |
| REFERÊNCIAS | 74 |

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM AVES MIGRATÓRIAS DURANTE O PERÍODO DE INVERNADA NO ESTADO DA PARAÍBA, NORDESTE DO BRASIL.

RESUMO

A migração é um comportamento biológico de várias espécies de aves e que pode favorecer a disseminação de microrganismos patogênicos através de longas distâncias, colocando em risco populações de outras espécies de aves, mamíferos, incluindo o homem. Muitos destes microrganismos podem ser resistentes a alguns tipos de antibióticos, sendo uma ameaça à saúde pública. Objetivou-se com este estudo, isolar, caracterizar e avaliar o perfil de resistência de enterobactérias encontradas em espécies de maçaricos no período de invernada na Paraíba. Foram coletadas amostras cloacais das espécies *Arenaria interpres*, *Calidris pusilla*, *Charadrius semipalmatus* e *Tringa flavipes*. Foram isoladas 47 cepas de 14 gêneros bacterianos distintos para os quais foram testados 12 antibióticos; para o teste de suscetibilidade *in vitro* através do método Disco-difusão o maior índice de resistência (68,8%) foi observado para todos os gêneros frente ao amoxicilina+ácido clavulânico, seguido por cefoxitina (63,8%) e ampiciliana (63,8%); Das cepas bacterianas que apresentaram halo fantasma, 6 (12,76%) cepas foram resistentes ao aztreonam, 1 (2,12%) foram resistentes a ceftazidima, 1 (2,12%) para cefoxitina, e 1 (2,12%) resistentes a Cefotaxima. Portanto, é importante o monitoramento de aves silvestres, pois estas são potenciais reservatórios de microrganismos patogênicos, com isso, auxiliam na disseminação de resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae; migração; aves limícolas; resistência bacteriana.

ISOLATION, CHARACTERIZATION ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE OF ENTEROBACTERIA ISOLATED IN MIGRATORY BIRDS DURING WINTER PERIOD IN PARAÍBA STATE, NORTHEASTERN BRAZIL.

ABSTRACT

Migration is a biological behavior of several bird species and may favor the spread of pathogenic microorganisms over long distances, putting populations of other species of birds, mammals, including humans at risk. Many of these microorganisms may be resistant to some types of antibiotics and pose a threat to public health. The objective of this study was to isolate, characterize and evaluate the resistance profile of enterobacteria found in species of tortoises in the wintering season in Paraíba. Cloacal samples of the species *Arenaria interpres*, *Calidris pusilla*, *Charadrius semipalmatus* and *Tringa flavipes* were collected. Seventeen strains were isolated from 14 different bacterial genera for which 12 antibiotics were tested; (68.8%) was observed for all genuses against amoxicillin + clavulanic acid, followed by cefoxitin (63.8%) and ampicillin (63,8%); Of the bacterial strains that presented phantom halo, 6 (12.76%) strains were resistant to aztreonam, 1 (2.12%) were resistant to ceftazidime, 1 (2.12%) to cefoxitin, and 1 (2.12%) resistant to Cefotaxime. Therefore, it is important to monitor wild birds, as these are potential reservoirs of pathogenic microorganisms, thereby helping to disseminate antimicrobial resistance.

Keywords: Enterobacteriaceae; migration; waders; Bacterial resistance.

INTRODUÇÃO

A migração é um comportamento biológico que se desenvolveu independentemente, em vários grupos animais, são movimentos direcionais em massa de um grande número de indivíduos de uma determinada espécie, no qual populações realizam deslocamentos de forma cíclica e sazonal, geralmente associados a fatores alimentares e reprodutivos necessários ao ciclo de vida desses animais (MORRISON, 1984 & ALERSTAM et al., 2003 ; BEGON et al., 1990).

As aves migratórias selecionam *habitats* de acordo com os hábitos alimentares, disponibilidade de recursos e táticas de forrageamento. Tais locais são importantes, pois, ao realizarem longas migrações, as aves precisam de áreas consideradas chave para realizarem processos fundamentais como muda, alimentação e ganho de reservas energéticas que serão necessárias para prosseguir sua longa migração (RODRIGUES, 2007; AZEVEDO-JÚNIOR et al., 2002). Nesses locais, as aves alimentam-se de uma variedade de peixes, musgos, algas, crustáceos, pequenos ovos de insetos e moluscos (MICHAUD; FERRON, 1990; SERRANO, 2010).

Periodicamente, os Charadriiformes migram para a costa sul-americana durante o inverno, chegando a realizar rotas entre 12.000 a 25.000 km entre os sítios reprodutivos e os de invernada e passam a maior parte do tempo nos sítios de repouso, se alimentando e descansando a fim de acumular reservas para a próxima etapa de voo (MYERS, et al., 2000). As aves chegam dos locais de reprodução entre agosto e setembro, permanecendo nos sítios de invernada até abril (LARRAZÁBAL, et al., 2002).

Algumas destas aves selvagens são de grande relevância para a saúde pública. Sua migração por longas distâncias e a mudança de *habitat* as expõem potencialmente a uma ampla variedade de patógenos e as torna potenciais propagadoras de doenças infecciosas por vários países, colocando em risco populações de outras espécies de aves, tanto de vida livre como de cativeiro e também mamíferos, incluindo seres humanos (ALTIZER et al, 2011; TAKEKAWA et al., 2010; GOMES, 2015).

Dentre esses patógenos, se encontram os membros da família *Enterobacteriaceae* que têm como reservatório o intestino do homem e animais e podem causar infecções intestinais e extra intestinais em aves imunocomprometidas (CORRÊA et al., 2013). Nesse aspecto, estas aves podem ser afetadas por bactérias oportunistas como *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Proteus* spp e *Citrobacter* spp (GERLACH, 1994), *Escherichia coli* (CORRÊA et al., 2013; KNOBL et al., 2011), *Salmonella* spp (VIGO et al., 2009; PICCIRILLO et al., 2010; TUNCA et al., 2012).

Para o combate de muitas dessas infecções bacterianas, o uso de antibióticos diminui as taxas de morbidade e mortalidade. Contudo, além da transmissão desses agentes patógenos entre homens e animais, outra preocupação a ser considerada é a transmissão de importantes fatores de resistência pelo mau uso desses fármacos, acelerando o processo natural de resistência das bactérias contra os antibióticos. Estudos realizados em psitacídeos mostram que manter essas aves podem albergar inúmeras bactérias que apresentam resistência a diversas classes de antimicrobianos (HIDASI et al., 2013; CORRÊA et al., 2013; MATIAS et al., 2015; COSTA, 2017).

Logo, a resistência bacteriana a antimicrobianos tem sido um problema crescente referente às doenças em animais e humanos. Este assunto frequentemente instiga um debate sobre a teoria que, a exposição aos antimicrobianos exerceria pressão de seleção para bactérias resistentes às drogas, aumentando desta forma a quantidade de bactérias multirresistentes encontradas na clínica veterinária e humana (GIBBS et al., 2007). Assim sendo, o exame de populações de aves a exemplo dos maçaricos, que não são frequentemente expostas aos antimicrobianos poderia auxiliar na compreensão desse assunto.

REFERENCIAL TEÓRICO

Aves migratórias no Continente Americano

Segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CRBO, 2014), o Brasil é o segundo país do mundo em diversidade de aves, com 1.901 espécies, e sugere que ao menos 197 espécies apresentam algum padrão de deslocamento considerado migratório. Desse total, 53% (104 espécies) reproduzem no Brasil e 47% (93 espécies) possuem seus sítios de reprodução em outros países, seja na região circumpolar relacionada à América do Norte e Groelândia (aves setentrionais), ou em áreas no sul da América do Sul e Antártida (meridionais).

As aves migratórias são espécies que têm pernas mais altas e bicos mais compridos para se alimentar de pequenos animais que se enterram na areia ou estão na superfície da água, realizando anualmente as mais extensas migrações internacionais. Algumas se deslocam por mais de 30 mil quilômetros por ano, a Paraíba está entre os lugares de concentração de aves migratórias, encontrando-se espécie na Ilha da Restinga e em São João do Cariri (ICMBio, 2014).

No outono de cada ano, milhares de aves que se reproduzem no hemisfério Norte se deslocam para diversos locais ao Sul, fugindo do inverno boreal que se aproxima e consequente redução na oferta e disponibilidade de alimento, sendo estes comumente chamados de locais de invernada. Logo, voam em busca de locais que propiciem maior disponibilidade de alimento e habitat para continuação dos processos biológicos como as mudas de penas, para depois retornarem às suas áreas de origem completando assim seu ciclo biológico (SICK, 1997; ALERSTAM & HEDENSTRÖN, 1998).

No Brasil, a região norte é considerada porta-de-entrada dos migrantes setentrionais no país; a Amazônia e a zona costeira das regiões Norte e Nordeste são locais com muitos registros de espécies migratórias do Hemisfério Norte. Estas aves chegam ao país entre setembro e outubro e regressam às suas áreas de reprodução entre março e maio (SICK, 2001) (Figura 1).

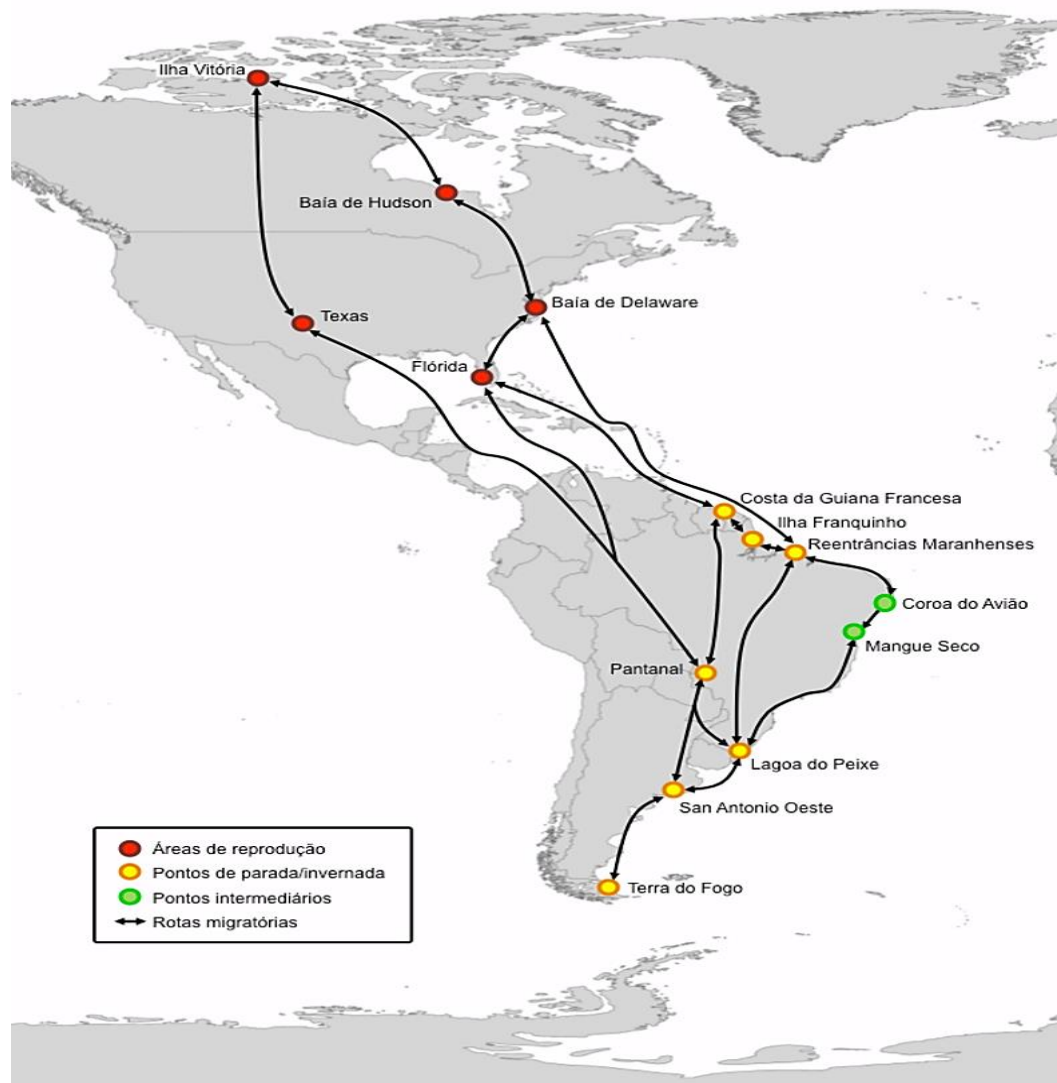


Figura 1. Principais rotas migratórias que interligam as Américas do Norte, Central e do Sul.
Adaptado: Hurtado (2013).

As batuíras e os maçaricos são dois dos grupos de animais com maior capacidade migratória, capazes de viajar milhares de quilômetros a cada ano, de forma que suas populações são compartilhadas por numerosos países, e por isto também é compartilhada a responsabilidade pela sua conservação.

Em termos de ações governamentais, o Brasil é signatário de acordos internacionais relacionados à proteção de espécies migratórias e dos habitats por elas utilizados, como a Convenção Internacional para Conservação da Fauna, Flora e Belezas Cênicas das Américas (Convenção de Washington), a qual trata de espécies migratórias em um dos seus capítulos, da Convenção de Ramsar, relativa à conservação e ambientes aquáticos, e da Rede Hemisférica de Reservas para

Aves Limícolas (aves que frequentam as zonas entre marés na busca de alimento, ambientes alagados ou marginais a corpos d'água) (ICMBio, 2016).

Estudos sobre migrações de aves no Brasil ainda precisam esclarecer lacunas de conhecimento sobre as rotas migratórias dentro do país. As aves marinhas constituem um grupo muito diversificado de espécies que se adaptaram com grande eficiência ao meio marinho estas permitem que as mesmas aproveitem os recursos até então inacessíveis para as aves (BRANCO, 2004; BRASIL, 2017).

Famílias Charadriidae e Scolopacidae

A ordem Charadriiformes têm várias espécies migratórias, estas seguem rotas com deslocamento entre os hemisférios Norte e Sul do planeta. Dentre elas estão o Atlântico oeste, Atlântico leste, Interior americano, Pacífico leste e oeste, África, mediterrâneo, Índia e Ásia-Austrália (BOERE & STROUD, 2006). Enquanto que no Brasil são descritas cinco rotas migratórias: Atlântico, Variação do interior do Nordeste, Brasil central, Amazônia central, Pantanal e Oeste Amazônico (ANTAS, 1983).

Esta ordem inclui uma alta diversidade de aves aquáticas conhecidas popularmente como maçaricos, baturas, gaivotas, perdizes-do-mar, trinta-réis, narcejas, entre outras. As aves migratórias têm capacidade de armazenar combustível, principalmente gordura, para atravessarem barreiras ecológicas em seus longos voos com pouca ou nenhuma parada. Algumas espécies percorrem anualmente distâncias de até 40.000 km entre as áreas reprodutivas e não reprodutivas. (HEDENSTRÖM & ALERSTAM, 1992; SICK, 1997; ALERSTAM et al., 2003).

A ordem dos Charadriiformes inclui 20 famílias, 85 gêneros e 366 espécies e é uma das maiores entre as aves (SIBLEY & AHLQUIST, 1990; CLEMENTS, 2000). A família Charadriidae é representada por 10 gêneros e 67 espécies (PIERSMA & WIERSMA, 1996). São aves de pequeno e médio porte, entre 12-38 cm, com a cabeça arredondada, largos olhos, bicos curtos e pontudos (MESSAGE & TAYLOR, 2005). Ocorrem em habitats abertos, secos ou alagados, costeiros, pastagens, tundra, até estepes e áreas semidesertas; possuem ampla distribuição mundial, exceto na Antártida (PIERSMA & WIERSMA, 1996).

A família Scolopacidae é representada por 24 gêneros e 86 espécies (PIERSMA et al., 1996). São aves de pequeno a médio porte (12-66 cm) com pernas curtas e longas, bico longo ou ligeiramente recurvado com função tátil para buscar alimento no solo. São essencialmente costeiros e algumas espécies, continentais; reproduzem-se em áreas abertas na tundra, estepes árticas, mas também em ambientes alagados, lodosos, ou com vegetação rasteira e até áreas florestadas (PIERSMA et al., 1996, MESSAGE & TAYLOR, 2005). Ocorrem em todas as regiões biogeográficas, à exceção da Antártida (PIERSMA et al., 1996).

Entre as espécies encontradas na Ilha da Restinga podemos citar a *Arenaria interpres* (Linnaeus, 1758) *Calidris pusilla* (Linnaeus, 1766), *Charadrius semipalmatus* (Bonaparte, 1825), *Limnodrumus griseus* (Gmelin, 1789), *Tringa flavipes* (Gmelin, 1789) e *Tringa semipalmata* (Gmelin, 1789) entre outras.

As aves limícolas são extremamente diversificadas em tamanho e forma do corpo, bem como padrões de habitat e comportamento de forrageamento.

Família Enterobacteriaceae

Segundo a Agência de Vigilância Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) maior e mais heterogênea família de bactérias Gram negativas de importância médica. São considerados atualmente 27 gêneros de 102 espécies e 08 subgrupos indefinidos.

O grupo das enterobactérias são microrganismos Gram negativos, não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativos, são anaeróbios facultativos (crescem em aerobiose e anaerobiose), fermentam glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivos, reduzem nitrato a nitrito e têm uma necessidade nutricional simples. A falta de atividade citocromo-oxidase constitui um importante característica, visto que, pode separar enterobactérias de outros bacilos gram-negativos fermentadores ou não fermentadores (ANVISA, 2004; O' HARA, 2005; KONEMAN et al., 2012; LAVAGNOLI et al., 2017).

A maioria das enterobactérias é encontrada no trato gastrointestinal de humanos, reino animal, na água, solo e vegetais os quais se tornam um potencial reservatório para esses agentes patogênicos.

As bactérias da família Enterobacteriaceae são as principais responsáveis das infecções intestinais, cerca de 70% as infecções urinárias e 50% das infecções nosocomiais. As infecções mais frequentes são causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Citrobacter* spp. e *Serratia marcescens* (ANVISA, 2004; ASENSIO et al., 2011).

Gênero *Escherichia*

Theodor Von Escherich foi o primeiro a descrever este agente em 1885, denominado *Bacterium coli commune* e, em 1958, recebeu a denominação atual, *Escherichia coli* em sua homenagem (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). Pertencente à família Enterobacteriaceae, o gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*. Sendo a espécie mais importante *E. coli* (CAMPOS & TRABULSI, 2002).

Escherichia coli é um bastonete curto, Gram-negativo, anaeróbico facultativo, não esporulado, medindo entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm, a maioria é móvel, devido a existência de flagelos peritríqueos. A temperatura ótima de crescimento é por volta dos 37 °C (BARNES et al., 2003; OLIVEIRA et al., EVANGELISTA, 1994; KAPER et al., 2004; QUINN et al., 2005). Formam colônias rosadas (lactose positiva) em meio ágar MacConkey, como propriedades bioquímicas, *E. coli* fermenta lactose, produz indol a partir do triptofano, fermenta glicose pela via de ácidos mistos. Não produz ácido sulfídrico (H₂S), são de oxidação negativa e catalase positiva, não utilizam citrato como fonte de carbono (BOOP et al., 2003).

A *E. coli* tem uma grande importância no campo da medicina tanto em virtude das infecções que desencadeia como também pela origem de estirpes multirresistentes aos antibióticos utilizados para a terapêutica, profilaxia ou como promotor de crescimento em animais (MURRAY et al., 2007).

Gênero *Klebsiella*

O gênero *Klebsiella* spp foi assim denominado por Trevisan em 1885, em homenagem a Edwin Klebs, microbiologista alemão. Trevisan também foi responsável pela descrição da espécie *K. pneumoniae* (UMED, 2002; MARTÍNEZ et al., 2004).

Neste gênero, podemos destacar a *Klebsiella pneumoniae* que pode ser encontrada em locais como plantas, solo, água e esgoto (PODSCHUM & ULLMANN, 1998). É um bacilo Gram-negativo, aeróbio facultativo, tem melhor crescimento em condições aeróbias, não esporulado e de tamanho que pode variar de 0 a 1 µm de diâmetro e 0,6 a 6 µm de comprimento, imóvel. Em ágar MacConkey, produz colônias róseas, brilhantes com aspecto elevado e com consistência mucoide. As colônias são grandes em razão de uma cápsula mucoide polissacarídica (Antígeno K) que as protege contra a fagocitose por granulócitos e ainda tem função auxiliar na aderência (UMED, 2002; MARTÍNEZ et al., 2004).

A *Klebsiella* spp destaca-se em suas propriedades bioquímicas pela reação de oxidase negativa, fermenta glicose, reduz nitrato, lisina positiva, citrato e indol negativos, tríplex açúcar ferro (TSI) positivo com produção de gás, metaboliza a lactose e também hidrolisa a uréia, formando gás ou não. A maioria das amostras é capaz de produzir o butilenoglicol como produto final da fermentação da glicose (GALES, 1997; KONEMAN et al., 2001).

As bactérias produtoras de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), dentre as Gram negativas, são as maiores responsáveis pela ocorrência e disseminação mundial de resistência em ambientes hospitalares (ANVISA, 2001; STURENBURG & MACK, 2003). Cerca de 2 a 5% das infecções hospitalares, respiratórias e urinárias, estão ligadas a estes de tipo de microrganismo. Pesquisas indicam que metade de todos os genes produtores de ESBL ocorre em *Klebsiella pneumoniae* (MARTINS-LOUOREIRO et al., 2001; PFALLER & SERGRETTI, 2006).

No Brasil, foram identificados casos de infecção por *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) nas cidades do Rio de Janeiro, São Paulo, Recife e Belo Horizonte (SOARES, 2012; MONTEIRO et al., 2009; PAVEZ et al., 2009).

Gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* faz parte da família *Pseudomonadaceae*, cujos membros caracterizam-se como bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvos e aeróbios estritos. A maioria das cepas apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, tendo um fundamental papel na patogenicidade. Podem medir

cerca de 2 a 4 μm de comprimento. Utilizam glicose e outros carboidratos, em geral são citocromo oxidase positivos. Também podem apresentar a capacidade de produzir pigmentação, como fluorescência de pirocianina (verde-azul) e pirogrina (verde-amarelo); algumas cepas também podem produzir pigmentos vermelho-escuro ou pretos (piorrubina e a piomelanina), finalmente, apresentam cheiro característico quando isoladas. (POLLACK, 2000; KONEMAN et al., 2001; WASHINGTON JUNIOR, 2006; WILCOX, 2007).

Podem crescer bem em meio ágar MacConkey, não são fermentadores de açúcares, sendo versáteis nutricionalmente. Crescem preferencialmente à temperatura de 30 a 37 °C, mas podem apresentar crescimento em temperaturas que variam de 5°C a 42 °C (KINSKA et al., 1999).

Pseudomonas spp pode ser encontrada na água, solo, plantas e alguns animais. Sua adaptação a várias condições ambientais contribui para o sucesso como patógeno oportunista, causando infecções em seres humanos, principalmente nos imunocomprometidos (POLLACK, 2000; TASHIRO et al., 2012).

A importância clínica e epidemiológica da *Pseudomonas aeruginosa* reside principalmente nas infecções relacionadas ao ambiente hospitalar, sendo uma das bactérias mais frequentes nessas infecções. Porém, podem ser responsáveis também por infecções adquiridas na comunidade. (HARRIS et al., 1999).

Gênero *Pseudomonas stutzeri*

Pseudomonas Stutzeri foi descrita pela primeira vez por Burri e Stuter em 1955, são pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, é amplamente encontrado em solos, água doce, oceanos e animais (LALUCAT et al., 2006). É uma bactéria Gram-negativa aeróbica e um tipo de bactéria desnitrificante que também é encontrado difusamente em ambientes hospitalares (MALHOTRA et al., 2008).

Estudos fenotípicos realizados por (STANIER et al., 1966), demonstraram que, além das suas colônias típicas, as cepas se apresentavam versáteis nutricionalmente, usando compostos de carbono raramente usados por outras *Pseudomonas* (por exemplo, amido, maltose e etilenogicol). Cepas das espécies foram identificadas entre desnitrificadores encontrados em materiais naturais. A estrutura e consistência das colônias são incomuns, colônias recém-isoladas são

aderentes, enrugadas, são na cor marrom-avermelhada e não amarela, tipicamente duros, secos, se assemelham a crateras com cristas elevadas.

Cepas de *P. stutzeri*, como a maioria das *Pseudomonas spp.* reconhecidas, podem crescer em meios quimicamente definidos, com íons amônio ou nitrato e uma única molécula orgânica como a única fonte de carbono e energia. Nenhum fator de crescimento adicional é necessário. Algumas cepas de *P. stutzeri* podem crescer diazotroficamente. Essa característica parece ser rara no gênero *Pseudomonas*.

Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* foi nomeado em homenagem ao cientista americano Daniel Salmon, microbiologista veterinário dos Estados Unidos e tem sido reconhecido como agente da doença há mais de 125 anos (GAST, 2003; CDC, 2014).

Salmonella é um bastonete Gram-negativo, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativa. As bactérias deste gênero possuem a forma de bacilos curtos, com largura de 0,7 a 1,5 µm e um comprimento de 2,0 a 5,0 µm. A temperatura de crescimento pode variar de 5 a 45°C, com temperatura ótima de 37°C. O pH varia entre 4 e 9, com pH ideal de 7 (D'AUST; MAURER, 2007; ICMSF, 1996).

Possuem catalase positiva, normalmente reduzem nitrato a nitrito, a maioria dos sorotipos fermenta glicose com produção de ácido e gás, não fermentam a lactose e a sacarose, produzem H₂S, não produzem uréase e indol (SILVA et al., 2006; D'AUST; MAURER, 2007).

Mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* já foram descritos, no entanto, menos de 100 sorotipos estão envolvidos em casos de infecções humanas (CDC, 2015d). A classificação de *Salmonella* em espécies é pouco usada nos estudos epidemiológicos, sendo mais conhecida e utilizada a nomenclatura relacionada com a sorotipagem. O esquema utilizado na divisão em sorotipos é o de Kauffmann-White, baseado nas diferenças encontradas em certas estruturas antigênicas superficiais das células. Essas estruturas são o envelope celular ou cápsula (antígeno capsular "Vi"), a parede celular (antígenos somáticos "O") e os flagelos (antígenos flagelares "H") (BRENNER et al., 2000; POPOFF; LE MINOR, 2005).

O gênero *Salmonella* é constituído por duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie (ou espécie, no caso de *S. bongori*) ainda é subdividida em função de seu perfil antigênico. A espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e as subespécies de *S. enterica* agrupam mais de 2.400 sorotipos (POPOFF; LE MINOR, 2005). As cepas mais frequentemente envolvidas nas doenças humanas são as de *S. enterica subsp. enterica*, que tem por habitat os animais de sangue quente e repondem por 99% das salmoneloses humanas. *S. enterica subsp. salamae*, *subsp. arizonae* e *subsp. diarizonae* são frequentemente isoladas do conteúdo intestinal de animais de sangue frio e raramente de humanos ou animais de sangue quente. *S. enterica subsp. houtenae* e *S. bongori* são predominantemente isoladas do ambiente e raramente são patogênicas para humanos (POPOFF; LE MINOR, 2005).

Salmonelas são bastante difundidas geograficamente em todo o mundo. A constituição genética desta bactéria permite sua adaptação a uma variedade de ambientes e animais, incluindo hospedeiros mamíferos e não mamíferos (SÁNCHEZ-VARGAS; ABU-EL-HAIJA; GÓMEZ-DUARTE, 2011), sendo o seu principal habitat o trato intestinal de humanos e animais. Pode-se citar como as principais fontes de *Salmonella* no ambiente, a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e ratos, e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas. Esta variedade de reservatórios e fontes de transmissão contribuem para a alta prevalência da infecção humana (SCALLAN et al., 2011).

Gênero *Providencia rettgeri*

Providencia é representada por um gênero de bacilos Gram negativos produtores de urease, a maioria das cepas é incapaz de fermentar lactose e apesar de raros estão presentes no meio ambiente e dificilmente são associados a doenças humanas.

Os primeiros membros desse gênero foram isolados por Leo F. Rettger, do Laboratório de Sheffield, na Universidade de Yale. Suas espécies se apresentam semelhantes às espécies de *Proteus* e *Morganella*. Seus gêneros comuns são *P. alcalifaciens*, *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *P. rustigianii* e *P. heimbachae*. Eles são freqüentemente isolados de feridas, do trato respiratório e do trato urinário (*P.*

alcalifaciens, *P. rettgeri* e *P. stuartii*), fezes de humanos (*P. alcalifaciens*), aves, fezes de répteis (*P. rettgeri*), garganta, períneo, axila e sangue de humanos (FARMER et al., 1977; O'HARA et al., 2000; MANOS et al., 2006; WASHINGTON et al., 2015).

O primeiro caso de relato de uma infecção humana por *Providencia rettgeri* foi publicado em 1951, por Goldfarb e De Bakey, descreveu um caso de empiema, as cepas resistentes a antibióticos desde organismo foram relatadas inicialmente por Traub e Craddock em 1971. Um segundo grande surto de *P. rettgeri* (infecção do trato urinário) foi relatado por Edwards e outros, em 1974. (GOLDFARB et al., 1951; TRAUB et al., 1971).

Com relação à suscetibilidade antimicrobiana, *P. rettgeri* é tipicamente resistente a gentamicina e tobramicina, mas suscetível à amicacina. Há relatos de beta lactamases de espectro estendido (ESBL) produzindo *P. rettgeri* na Europa Oriental e Nova Déli, e metalase-beta lactamase (NDM-1) produzindo isolados de *P. rettgeri* na América do Sul e Ásia (CARVALHO et al., 2013; TADA et al., 2014).

Gênero *Acinetobacter parvus*

O gênero *Acinetobacter* é composto por cocobacilos Gram-negativos, não móveis, estritamente aeróbicos, oxidase-negativos, não fermentadores, catalase positiva, apresentando melhores faixas de crescimento entre 20 e 30°C, (BOUVET e GRIMONT, 1986; BERGOGNE-BÉRÉZIN e TOWNER, 1996) pode ser encontrado no solo e água doce. Taxonomia *Acinetobacter* mudou marcadamente ao longo do tempo, e 33 espécies genômicas nomeadas e sem nome (gen. sp.) são atualmente reconhecidos dentro do gênero (LEE et al., 2010). Uma ampla variedade de espécies tem sido descrita como agente etiológico de doença invasiva. *A. calcoaceticus* (gen. Sp. 1), *A. baumannii* (gen. sp. 2), *A. pittii* (anteriormente o nome do gen. sp. 3), e *A. nosocomialis* (anteriormente 13TU, Tjernberg e Ursing) (GERNERSMIDT et al., 1991; NEMEC et al., 2011) são fenotipicamente semelhantes.

A. baumannii tem sido tradicionalmente considerado de o maior significado clínico. Esta espécie surgiu como um organismo particularmente importante em unidades de terapia intensiva, mais provavelmente relacionado ao diagnóstico e

procedimentos terapêuticos utilizados em hospitais nas últimas duas décadas. Infecções nosocomiais causadas por outras espécies de *Acinetobacter* são raras e mortalidade materna rara, e seu curso clínico geralmente é benigno, embora sepse com risco de vida tenha sido observada ocasionalmente (Gradon et al., 1992). Não há relatos de casos detalhados na literatura sobre *A. parvus*, nosocomial ou comunidade adquirida. Uma referência relata uma cepa de *A. parvus* isolada de sangue, sugerindo uma infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter (NEMEC et al., 2003). O caso humano relatado em quem foi diagnosticada bacteremia por *A. parvus* apresentou uma doença neoplásica, um dos fatores predisponentes mais comuns às infecções por *Acinetobacter*, trauma e queimaduras. Não há relatos de casos detalhados na literatura sobre *A. parvus*, nosocomial ou comunidade adquirida.

Gênero *Enterobacter asburiae*

Enterobacter asburiae uma bactéria Gram – negativa anaeróbia facultativa não esporulada. A espécie nova que consiste em 71 cepas, sendo que 70 já foram isoladas em seres humanos. Suas cepas apresentaram reações positivas em testes para vermelho de metila, utilização de citrato (Simmons e Christensen), hidrólise de uréia, L-ornitina descarboxilase, crescimento em KCN, produção de ácido e gás a partir de D-glicose e produção de ácido de L-arabinose, celobiose, glicerol (negativo em 1 a 2 dias, positivo em 3 a 7 dias), lactose, D-manitol, alfa-metil-D-glucosídeo, salicina, D-sorbitol, sacarose, trealose e D-xilose. Eles deram reações negativas no teste de Voges-Proskauer e em testes para indol, produção de H₂S, fenilalanina, L-lisina descarboxilase, motilidade.

Este organismo foi descrito e nomeado por Brenner e colaboradores em 1986, *Enterobacter asburiae* é nomeado em homenagem a “Mary Alyce FifeAsbury”. Cerca de 5 a 63% destas enterobactérias tem parentesco com a *Enterobacter cloacae*, *Erwinia dissolvens*, *Enterobacter gergoviae* entre outras. Todas as cepas testadas eram suscetíveis à gentamicina e sulfadiazida, a maioria sendo suscetível ao Clorafenicol, colistina, ácido nalidíxico. Todas as cepas eram resistentes à ampicilina, cefalotina, penicilina ou moderadamente resistente à tetraciclina.

As estirpes foram isoladas a partir de uma variedade de fontes humanas, sendo as mais prevalentes a urina (16 estirpes), fontes respiratórias (16 estirpes),

fezes (12 estirpes), feridas (11 estirpes), sangue (7 estirpes), também foram encontradas em uma grande variedade de culturas, como pepino, feijão comum e arroz, contudo, seu significado clínico ainda não é conhecido (MCINROY et al., 1995; ELBELTAGY et al., 2001; ASIS et al., 2004; BRENNER et al., 1986; MARDANEH & DALLAL, 2016).

Resistência aos Antimicrobianos

A descoberta acidental em 1929 da penicilina em uma das experiências de Alexander Fleming, representou um marco importante na era dos antibióticos. A partir dessa descoberta foi possível diminuir expressivamente o número de mortes causadas por doenças infecciosas (FLEMING, 1929; TODAR, 2008; CALIXTO & CAVALHEIRO, 2012). A droga foi denominada de penicilina em razão de ser produzida pelo fungo *Penicillium notatum* (PEREIRA & PITA, 2005; SOUSA, 2006; TODAR, 2008).

A descoberta dos antimicrobianos, fármacos milagrosos do século XX, foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária e agricultura (BEOVIC, 2006; MARTINEZ, 2009). Ainda em meados de 1942 Fleming relatou sobre sua primeira experiência no tratamento de um homem utilizando a penicilina (CALIXTO et al., 2012).

Contudo, o aparecimento de resistência a antimicrobianos é um dos grandes problemas na medicina humana e veterinária, sendo causado basicamente pela evolução das bactérias, ou seja, pela mutação espontânea e recombinação de genes (reprodução), que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural aos mais aptos (ANDRADE, 2008). A resistência consiste na habilidade de um microrganismo de tolerar a presença de um antibiótico no meio ao qual seria sensível anteriormente, tornando os tratamentos convencionais ineficazes (WHO, 2015).

Os agentes antimicrobianos não motivam a bactéria a se tornar resistente, porém seu uso seleciona preferencialmente as bactérias resistentes. Alguns genes que codificam a resistência foram identificados em culturas de bactérias obtidas antes de os agentes antimicrobianos terem sido usados (MADDISON et al., 2010).

O problema da resistência microbiana tem aumentado rapidamente pelo mundo todo nos últimos anos, provocando a necessidade de se conhecer o perfil de sensibilidade das bactérias causadoras de infecções mais frequentes, como também o modo de disseminação da resistência (TOSIN, 2001).

A resistência a antimicrobianos pode ser de dois tipos: intrínseca (natural) ou extrínseca (adquirida). Na resistência intrínseca, certas espécies de bactérias podem resistir à ação de um dado antibiótico como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente à espécie. Esse tipo de resistência é consistentemente herdada pelas células-filhas, estando presente na maioria das estirpes que compõem um grupo, um gênero ou uma espécie bacteriana particular (BLAIR et al., 2015). Já a resistência extrínseca em geral é decorrente do resultado de mutações no material genético bacteriano e seleção ou aquisição de material genético codificando genes de resistência, através de bacteriófagos (transdução), incorporação do DNA (transformação) ou aquisição de um plasmídeo (conjugação) (TAVARES, 2000, DZIDIC et al., 2008; COAN, 2014; COSTA, 2016).

As bactérias podem ser classificadas como resistentes, intermediárias e sensíveis aos antibióticos. Através do antibiograma. Nele, os isolados bacterianos são plaqueados em ágar contendo discos de antibióticos e após crescimento por tempo determinado fazendo-se a medição dos halos de inibição comparando-se com os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (VASCONCELOS, 2017). Considera-se que o isolado é sensível quando ele é tratado apropriadamente com a dosagem de um agente antimicrobiano recomendado; intermediária, quando o diâmetro do halo se encontra próximo ao resistente; e resistente quando os isolados não são inibidos pelas concentrações do agente microbiano obtidas normalmente com os tratamentos usuais (SILVA, 2007; ANVISA, 2018).

No Brasil, com vistas a ampliar o controle sobre a prescrição e comercialização dos antimicrobianos para humanos e contribuir para a redução da resistência bacteriana na comunidade, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução RDC nº. 20, de 5 de maio de 2011, dispondo sobre a venda controlada, com retenção de receita, destas drogas (BRASIL, 2011).

Mecanismo de Resistência aos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são um grupo de antibióticos que se define pela presença do anel β -lactâmico (Figura 1), sendo uma classe de elevada importância devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade. Esta classe de antibióticos inclui as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactâmico e ainda os inibidores de β -lactamases, que agem como coadjuvante dos betalactâmicos, com mínima atividade antimicrobiana intrínseca, os quais atuam impedindo a ação das enzimas que clivam o anel betalactâmico presente em todos os fármacos desta classe e que possui importância fundamental para a eficácia terapêutica desses antibióticos (FUCHS et al., 2004; PETRI, 2007).

Estruturas ligadas diretamente a esse núcleo comum diferenciam penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes e monobactâmicos (FUCHS et al., 2004).

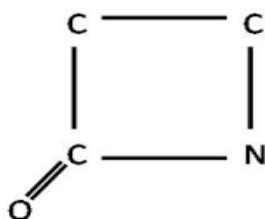


Figura 2. Anel Betalactâmico (FERNANDES, 2014)

O anel β -lactâmico determina não só o mecanismo de ação, sendo esse a inibição da síntese do peptidoglicano; como também a baixa toxicidade direta, visto que atuam na parede celular e esta não está presente nas células eucariotas do homem (SUAREZ & GUDIOL, 2009).

Logo, o mecanismo de ação do antimicrobiano, em síntese, funciona através da ligação do anel β -lactâmico às proteínas da parede celular bacteriana (PBPs). Esta ligação faz com que as PBPs não exerçam seu papel, gerando o rompimento da parede celular e morte bacteriana (SUÁREZ & GUDIOL, 2009). Em contrapartida à ação dos antibióticos β -lactâmicos, existem as β -lactamases, que são definidas como enzimas capazes de clivar o anel β -lactâmico, ou seja, inativam a ação dos antibióticos (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Há diferentes tipos de β -lactamases, dentre elas, as chamadas β -lactamases de Espectro Ampliado (ESBL), produzidas a partir de mutações em genes plasmidiais e que têm grande relevância clínica e epidemiológica (MARTIS & PICOLI, 2011). A localização desse gene de resistência no plasmídeo facilita a sua disseminação entre as bactérias Gram-negativas, principalmente entre as enterobactérias, mediante processo de conjugação. Esses plasmídeos de resistência muitas vezes já possuem genes que atribuem resistência a outras classes de drogas como as quinolonas e os aminoglicosídeos e, por isso cepas produtoras de ESBL de ambiente hospitalar tendem a ser multirresistentes (LAGO, FUENTEFRÍA & FUENTEFRÍA, 2010).

A resistência aos β -lactâmicos dependerá da quantidade de enzima produzida, da habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o β -lactâmico penetra pela membrana externa (BRADFORD, 2001; SOUSA JÚNIOR et al., 2004).

As aminopenicilinas, tais como a amoxicilina e ampicilina, são betalactâmicos de espectro aumentado e possuem eficácia também na presença de bactérias Gram-negativas susceptíveis, a exemplo da *E. coli* e *Proteus mirabilis*. Já as penicilinas de largo espectro como ticarcilina, piperacilina, entre outras, estendem sua atividade à *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA, 2006; KATZUNG, 2007; PETRI, 2007; INFRAMED, 2011).

Ainda dentro desta classe temos as cefalosporinas, que possuem três gerações de antimicrobianos. Podemos destacar as de terceira geração, como a Ceftriaxona e Cefotaxima, ambas têm maior eficácia sobre bacilos Gram-negativos, como enterobactérias, quando comparado a 1ª e a 2ª geração. A de 3ª geração ainda abrange antimicrobianos como a Ceftazidima e a Cefoperazona, ambos com atividade frente à *Pseudomonas aeruginosa* (FUCHS, 2004; PETRI, 2007).

Classificação das β -lactamases

Embora todas as β -lactamases catalisem a mesma reação, essas enzimas foram classificadas segundo a estrutura e as características funcionais e bioquímicas. A classificação foi baseada na estrutura molecular inicialmente proposta

por AMBLER (1980) na qual dividiu as Betalactamases em quatro classes (A, B, C e D) baseando na similaridade entre as sequências de aminoácidos.

Logo, as serina-bectalamases foram inseridas na classe A e as metalo-bectalamases incluídas na classe B. Posteriormente a classe C foi descrita e a Classe D, que inclui Betalactamases que hidrolisam a oxacilina foi separada das demais serina-bectalamases ao final da década de 80 (HALL & BARLOW, 2005).

A segunda importante classificação foi proposta por Bush, Jacoby e Medeiros (1995), que dividiram as β -lactamases em quatro grupos (1, 2, 3 e 4) levando em consideração, além da estrutura, o seu aspecto funcional, seus substratos e sensibilidade aos inibidores de Betalactamases (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995).

O grupo 1 é composto pelas enzimas que não são inibidas pelo ácido clavulânico (cefalosporinas), o grupo 2 pelas enzimas de largo espectro inibidas pelo ácido clavulânico (penicilinas e cefalosporinas). O grupo 3 por enzimas que necessitam do zinco como cofator, atuam sobre penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Os membros deste grupo não são inibidos pelo ácido clavulânico, entretanto, o ácido etilenoaminotetracético (EDTA), que possui ação quelante sobre o zinco, é capaz de inibi-los (metalo- β -lactamases). O grupo 4 é composto pelas enzimas penicilinas que são inibidas pelo ácido clavulânico (β -lactamases codificadas pelo plasmídeo OXA) (SHAH, 2004; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

β -Lactamase de Espectro Ampliado (ESBL)

O desenvolvimento das penicilinas de largo espectro e das cefalosporinas de primeira geração, na década de 1960, rapidamente foi seguido pela emergência de resistência mediada por β -lactamases e o reconhecimento de muitos tipos de β -lactamases. Nesta época, surgiram as primeiras classificações baseadas em propriedades funcionais, que incluíam a atividade contra cefaloridina e benzilpenicilina. Por isso, as β -lactamases foram denominadas de cefalosporinas, penicilinas ou de largo espectro, quando ambos os substratos eram hidrolisados (FLEMMIN et al., 1963; RICKMOND & SYKES, 1973).

Entre as enzimas de largo espectro, encontram-se as TEM-1, TEM-2 e SHV-1 pertencentes ao grupo funcional 2b e classe molecular A, estas rapidamente

tornaram-se as principais responsáveis pela resistência às penicilinas de largo espectro e às cefalosporinas de espectro reduzido. Na década de 1970, a β -lactamase TEM-1 encontrava-se presente em 30 a 50% dos isolados de *Escherichia coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae, assim como em *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (MATTHEW, 1979).

A disseminação das enzimas plasmídeo-mediadas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 precipitaram o início da pesquisa dos antimicrobianos β -lactâmicos estáveis a β -lactamases, a partir da segunda metade da década de 1970. Descobriu-se em diferentes anos, as cefamicinas, as cefalosporinas de terceira e quarta gerações, os monobactâmicos e os carbapenêmicos. Por razões de conveniência, custo e benefício, as cefalosporinas de terceira e quarta geração, em especial a cefuroxima, a cefotaxima, a ceftriaxona, a ceftazidima e a cefepima tornaram-se drogas amplamente utilizadas, passando a ser consideradas tratamento padrão para pneumonias, infecções intra-abdominais e do trato urinário em muitos hospitais do mundo (PATERSON & BONOMO, 2005; LIVERMORE, 2008).

Entretanto, o uso das cefalosporinas de terceira geração, introduzidas no início dos anos de 1980, exerceu uma forte pressão seletiva, sendo descrita, em 1983, na Alemanha, uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* e de *Serratia marcescens* com a beta-lactamase SHV-2, uma mutante de SHV-1, capaz de hidrolisar esses novos compostos (KNOTHE, et al.;1983). Posteriormente, na França, foi relatada uma série de diferentes cefotaximases e ceftazidimases, identificadas como mutantes de TEM e SHV (SIROT et al.; 1987). A ampliação do espectro de ação deu origem ao termo beta-lactamases de espectro ampliado (Extended-Spectrum β -Lactamase – ESBL, inicialmente extended-broad-spectrum β -lactamase) que foram classificadas por Bush e colaboradores (1995) no grupo funcional 2be. O termo foi baseado no fato dessas enzimas terem ampliado o espectro de atividade comparado com as clássicas enzimas TEM e SHV de largo espectro que eram suas ancestrais, serem capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração 10% a mais do que hidrolisam as benzilpenicilinas, além de serem inibidas por compostos como ácido clavulânico.

Na classe 2be também foi acomodada a beta-lactamase cromossômica K1 (KOXY) da *Klebsiella oxytoca* que possui uma atividade mais ampla em relação a SHV-1. Cerca de 20% das *K. oxytoca*, mutantes, hiperproduzem essa beta-lactamase e são resistentes à todas as penicilinas, a cefotaxima, a ceftriaxona, a

cefuroxima e ao aztreonam, exceto aos carbapenêmicos, às cefamicinas (BUSH et al., 1995; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

As ESBL surgiram de mutações pontuais ocorridas nos genes estruturais, os quais codificam as β -lactamases TEM-1, TEM-2 e SHV-1 em locais próximos a seus sítios ativos. Causam, assim, alterações suficientes na sequência de aminoácidos capazes de produzir novas enzimas com novos substratos preferenciais (DU BOIS et al., 1995). Em geral, as ESBL são enzimas que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações e o monobactâmico aztreonam. No entanto, não atuam em cefamicinas e carbapenêmicos. Em contraste, as ESBL são inibidas por inibidores de beta-lactamases comercialmente disponíveis, incluindo o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam (PEREZ et al., 2007).

À medida que novas beta-lactamases foram sendo catalogadas, a definição original do termo ESBL foi estendida para incluir: (1) aquelas enzimas com espectro similar aos mutantes TEM e SHV, derivadas de outras fontes, como os tipos CTX-M, PER, VEB e GES; (2) mutantes TEM e SHV com atividade ESBL *borderline*, ou seja, aumento de atividade contra cefalosporinas de terceira geração 10% a menos do que hidrolisam as benzilpenicilinas, como a enzima TEM-12; e (3) várias β -lactamases que conferem uma resistência ampliada em relação aos seus tipos parentais, entretanto, não se enquadram na definição do grupo 2be, como as derivadas de OXA da classe molecular D e mutantes AmpC, com atividade aumentada contra cefepima da classe molecular C detectada em isolados clínicos de *Serratia* e *Enterobacter* (LIVERMORE, 2008).

Atualmente uma definição de ESBL que ainda serviria, embora não exista um consenso sobre a definição precisa de ESBL, seria de uma β -lactamase geralmente adquirida, a qual é capaz de conferir resistência às cefalosporinas de terceira geração, mas não aos carbapenêmicos ou que tenha habilidade aumentada de hidrólise comparada aos seus ancestrais clássicos (PATERSON & BONOMO, 2005; LIVERMORE, 2008), pareceria melhor que o termo ESBL continuasse com a ampla e moderna definição, mas deveria ser sempre acompanhado da menção da classe de ESBL, ou seja, ESBL TEM, ESBL OXA, ESBL CTX-M ou AmpC de espectro ampliado. Deve ser salientado que a grande maioria das ESBL, encontradas em isolados clínicos, pertencem às famílias TEM, SHV e CTX-M, permanecendo raros

os tipos que complicam a classificação como as OXA, GES e AmpC de espectro ampliado (LIVERMORE, 2008).

A evolução das ESBLs, com múltiplas mudanças de aminoácidos, reflete o acúmulo de mutações aleatórias que gradativamente aumentam a atividade destas cefalosporinases até a expressão de resistências clinicamente significativas. Mesmo com o desenvolvimento de novos β -lactâmicos há a emergência de novas β -lactamases de todas as linhagens causando resistência às novas drogas (BRADFORD, 2001; RICE, 2001; PATERSON & BONOMO, 2005).

Apesar de amostras produtoras de ESBL serem classificadas como sensíveis a vários antibióticos β -lactâmicos, vários relatos de falhas terapêuticas têm sido descritos. Isso porque a resistência a esse agente pode não ser identificada durante o antibiograma, visto que a produção da enzima ocorre em pequenas quantidades e varia conforme o tempo de incubação. Além disso, o grau de resistência aos β -lactâmicos é variável e depende da quantidade de enzima produzida, do inóculo, de sua habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o antibiótico penetra na membrana externa da bactéria (SADER, 2000).

β -Lactamases AmpC

A primeira enzima bacteriana relatada para destruir a penicilina foi a β -lactamase AmpC de *Escherichia coli*, embora não tenha sido assim denominada em 1940 (ABRAHAN, et al., 1940). As cepas de AmpC produziram pouca ou nenhuma β -lactamase, sugerindo que o AmpC era o gene estrutural da enzima (BURMAN, et al., 1973). A maior parte da nomenclatura mudou ao longo dos anos, mas a designação AmpC persistiu. A sequência do gene AmpC de *E. coli* foi relatada em 1981 (JAURIM & GRUNDSTRÖM, 1981). Na classificação estrutural Ambler das β -lactamases (AMBLER, 1980), as enzimas AmpC pertencem à classe C, enquanto no esquema de classificação funcional de Bush et al. (BRADFORD, 1999), foram designados para o grupo 1.

As β -lactamases conhecidas como cefalosporinases cromossomais ou AmpC são enzimas codificadas por genes de origem cromossômica ou plasmidial. São capazes de hidrolisar penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de até terceira geração. A resistência à cefoxitina, do grupo das cefamicinas, é o principal marcador da expressão de AmpC. Cepas produtoras de AmpC são, habitualmente,

resistentes também a drogas não β -lactâmicas, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas e trimetopim. As β -lactamases AmpC também não são inibidas pelo ácido clavulânico e o tazobactam e não são capazes de hidrolisar cefalosporinas de quarta geração e carbapenêmicos (JACOBY, 2009; BUSH & JACOBY, 2010).

Carbapenemases

As carbapenemase são enzimas capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, carbapenêmicos), classe de antimicrobiano mais diversificada e largamente utilizada. Ressaltando ainda, que nestes casos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas apresentam, muitas vezes, sensibilidade diminuída, deixando a antibioticoterapia bastante reduzida (HIRSCH & TAM, 2010; AREND, 2014; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

A primeira enterobactéria produtora de carbapenemase (Nmca) foi descrita em 1993, na França, sendo de um isolado de *Enterobacter cloacae* (NAAS; NORDMANN, 1994). Desde então, diversas carbapenemases têm sido identificadas. Na atualidade, as de destaque são *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e a New Delhi Metalo β -lactamase (NDM), sendo responsáveis por surtos em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (DORTET et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012; VIEIRA, 2013; DJAHMI et al., 2014).

Com o aparecimento de bactérias produtoras de β -lactamases, especialmente enterobactérias, houve o crescente uso de drogas alternativas para o tratamento, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Com a larga administração destas, os micro-organismos adquiriram menor susceptibilidade às mesmas, com isso passou-se a usar carbapenêmicos para tratamento de bactérias multirresistentes. Assim, houve o surgimento de enzimas mais versáteis, com espectro mais amplo que ESBL, as quais conferem resistência a todos os β -lactâmicos - as carbapenemases (THOMSON, 2010; TZOUVELEKIS et al., 2012; DJAHMI et al., 2014; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

Esse grupo de antibióticos incluem o imipenem, meropenem, ertapenem, e o mais recente descoberto, o doripenem, que combina o espectro de ação do Imipenem e meropenem, tendo maior eficácia no tratamento contra infecções por *Pseudomonas aeruginosa* (ZHANEL et al., 2007).

MALDI-TOF MS

A utilização da espectrometria de massa (MS) como forma de identificação de microrganismos se iniciou nos anos 1970, mas o grande impulso para a evolução da tecnologia foi dado por Tanaka et al. (1988).

A matriz foi uma componente chave para o desenvolvimento da tecnologia. Ela possui quatro utilidades: 1) ajuda a romper as células e extrair as proteínas, por ser de natureza ácida; 2) separa as moléculas de proteínas que são aderidas; 3) absorve a energia do laser e provoca a dessorção das moléculas (extração da placa sólida onde estão aderidas para o estado gasoso) e 4) doação de H^+ para as moléculas que passam a ser íons de carga positiva (TANAKA et al., 1988).

O termo MALDI é derivado da língua inglesa: *Mass Assisted Laser Desorption/Ionization*, ou seja, dessorção/ionização por laser assistido por matriz. Os equipamentos de MS apresentam variados analisadores que separam os íons de diferentes pesos/massas. Entre tais analisadores/separadores de íons, há aqueles que diferenciam os pesos/massas pelo tempo de voo destas moléculas em tubo de vácuo (TOF: *time of flight*).

A matriz absorve a energia do laser, ocorrendo assim a evaporação da amostra com a formação de íons com massas diferentes. Estes íons formados, apresentando carga +1, são acelerados sob a influência do campo elétrico de carga positiva para dentro de um tubo de voo, no qual se encontra em sua extremidade o detector. O tempo de voo de cada partícula até o detector é utilizado para calcular sua massa. O espectro de massa (EM) da amostra é formado pela soma dos íons analisados. A relação massa/carga corresponde ao eixo das abscissas. Já a intensidade do sinal encontra-se no eixo das ordenadas, que é proporcional à quantidade de íons de mesma massa (CARBONELLE; NASSIF, 2011).

Quando se compara a tecnologia MALDI-TOF MS com outras técnicas laboratoriais para identificação de microrganismos, a principal vantagem dessa tecnologia é a agilidade para obtenção dos resultados. Entre o preparo do depósito e a leitura final, um resultado isolado pode ser obtido em menos de 30 minutos (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

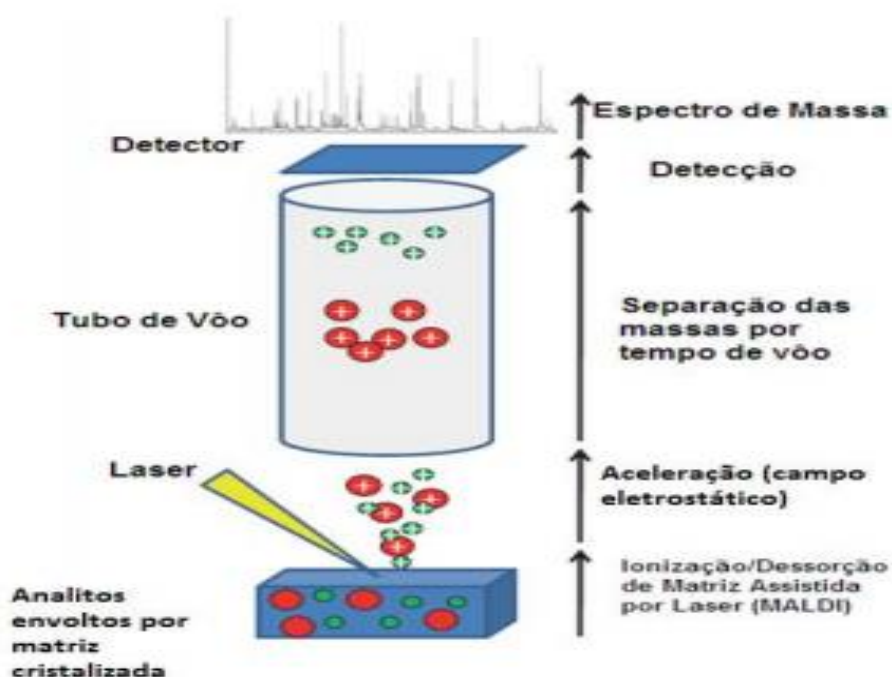


Figura 3. Princípios da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF) (Adaptado por Croxotto, A. et al., 2012).

Logo, o objetivo do nosso trabalho é isolar, caracterizar e analisar o perfil de resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de aves limícolas migratórias (maçaricos), encontradas na Ilha da Restinga, Cabedelo, no Estado da Paraíba.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P., and E. CHAIN. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature.**; n.146; v. 37. 1940.
- ALERSTAM, T., HEDENTRÖM A. A. & ÅKESSON S., Long distance migration: evolution and determinants. **Oikos** , v.103, p. 247- 260. 2003.
- ALTIZER, S.; BARTEL, R.; HAN, B. A. Animal migration and infectious disease risk. **Science New York**, v.331, n.1, p. 296-302, 2011.
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences.** v.16; n. 289; p.321-331. 1980.
- ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária.** 3 ed. São Paulo: Roca, 2008.
- ANTAS, P. T. Z. Migration of Neartic shorebirds (Charadriidae and Scolopacidae) in Brazil – flyways and their different seasonal use. **Wader Study Group Bulletin.** v. 39; n.1; p.52-56. 1983
- ANVISA-** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Projeto Hospitais Sentinela. Brasil. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/sentinela/>>. Acesso em 31 de maio de 2018.
- ANVISA-** Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. M2-A8, v. 23, n. 1, Substitui a Norma M2-A7, v. 20, n. 1. 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2018.
- AREND, L. N. V. S. **Caracterização molecular, fenotípica e epidemiológica de micro-organismos produtores de carbapenemase KPC isolados no Estado do Paraná.** 2014. 68 f. Dissertação [Mestrado em Medicina Interna], Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- ASIS, C.A Jr, ADACHI, K. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters Applied Microbiology.** n. 38; v.1; p.19-23. 2004.
- AZEVEDO-JÚNIOR, S. M.; DIAS FILHO, M. M.; LAERZÁBAL. M. E. L & FERNANDES C. J. G. Capacidade de vôo de quatro espécies de Charadriiformes (Aves) capturadas em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.19, n.1, p.183-189. 2002.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis In: SAIF, W.M. Diseases of poultry. Ed.11ª. **Iowa State University Press.** p.138-144, 2003.
- BEGON, M., HAPER, J. L.; TOWNSEND, C. R.; Ecology: individuals, populations and communities. Ed. 2ª. **Blackwell Scientific Publications.** 1990.
- BERGOGNE-BÉREZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter spp* as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. **Clinical Microbiology. Review**, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996

BEOVIC, B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 280-287. 2006.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p.455-469. 2009

BOPP, C.A.; BRENNER, F.W.; FIELD, P.A.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N. A. – *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. - **Manual of Clinical Microbiology**. Ed. 8ª. p.654-71, 2003.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp nov., and *Acinetobacter junii* sp nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum Beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. NewYork: **Clinical Microbiology Review**. v. 14, n. 4, p. 933-951. 2001.

BRANCO, J. O. **Aves marinhas e insulares brasileiras: biologia e conservação**. Editora da UNIVALI, Itajaí, SC. 266p. 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 2017. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/index.php/comunicacao/agenciainformma?view=blog&id=2541>> Acesso em: 08 de junho de 2018.

BRENNER, D.J; MCWHORTER A, KAI, A, et al. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. **Journal Clinical Microbiology**. v. 6; n. 23; p. 1114-20. 1986.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**. V. 39, p. 1211-1233. 1995.

CALIXTO, C. M. F & CAVALHEIRO, E. T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e momento Histórico no Desenvolvimento Científico. **Química Nova na Escola**. v. 34, n.3, p. 118-123, agosto 2012.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia*. In.: TRABULSI, L.R. et al. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: **Atheneu**, 2002, p.215-228.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P.S.; ALBANO R.M, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. n. 68; v.12; p.2956–2957. 2013.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States**, 2013. Atlanta, USA. 2014a. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2018.

CLEMENTS, J. F. Birds of the world: check –list. **Ibis Publishing Company**, Temecula, Califórnia. Ed. 5ª; 2000.

COAN, Marina Manrique. **Deteção de genes codificadores de resistência a antimicrobianos de importância clínica em amostras de carne de frango**. 2014. Dissertação [Mestrado em Serviços de Saúde Pública] - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/D.6.2014.tde-23102014-085220. Acesso em: 11 de setembro de 2018.

CORREIA, I.M.; FLORES, F.; SCHNEIDERS, G.H. et al. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. Em psitacídeos. **Pesquisa. Veterinária. Brasileira**. v.33, p.241-246, 2013.

COSTA, A. L.P; JUNIOR, A.C.S.S. Resistência Bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: **Uma Breve revisão de literatura**. v.7, n.2, p. 45-57. 2017.

DJAHMI, N.; DUNYACH-REMY, C.; PANTEL, A.; DEKHIL, M.; SOTTO, A.; LAVIGNE, J. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the NDMtype carbapenemases in Gram-negative bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DU BOIS, S. K.; MARRIOT, M. S.; AMYES, S. G .B. TEM- and SHV- derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 35, p.7-22.1995.

ELBELTAGY, A; NISHIOKA, K.; SATO, T. et al. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied Environmental Microbiology**. v. 11; n. 67; p.5285-93. 2001.

EVANGELISTA, J. Contaminações em Alimentos. Alimentos um Estado Abrangente. RJ, SP, BH: **Atheneu**, c.7, p.175-230. 1994.

FARMER, J.J.; HICKMAN, F.W.; BRENNER, D.J.; SCHREIBER, M.; RICKENBACH, D.G.; Unusual *Enterobacteriaceae*. *Proteus rettgeri* that change into *Providencia stuartii*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 6; n.4; p. 373–378. 1977.

FLEMING, A. The antibacterial action of cultures of Penicillin, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 10; n.3; p.226-236. 1929.

FLEMMING, P.C.; GOLDNER, M.; GLASS, D. G. Observations on the nature, distribution, and significance of cephalosporinase. **Lancet**, p.1399-1401. 1963.

FUCHS, F. D.; WANNMADER, L.; FERREIRA, M. B. C. Antibióticos Betalactâmicos. In: **Farmacologia Clínica. Fundamentos da terapêutica racional**. 3ª Edição. Guanabara Koogan, 2004.

GALES, A. C.; BOLMSTROM, A.; SAMPAIO, J.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL isolated in hospitals in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.1, n. 4, p.196-203.1997.

GAST, R. K. Salmonella Infections. In: SAIF, Y. M. Diseases of Poultry. Ames, Iowa: **Iowa State Press**, 2003. p. 567-614.

GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. Avian Medicine: Principles and application (Eds.). **Wingers Publishing, Inc.**, Lake Worth, Florida, 1994. p.949-983.

GIBBS, P. S., KASA, R.; NEWBREY, J. L.; PETERMANN, S. R., WOOLWY, R. E.; VINSON, H. M.; REED, W. Identification, antimicrobial resistance profiles, and virulence of numbers from the Family *Enterobacteriaceae* form the feces of yellow-head blackbirds (*xanthocephalus xanthocephalus*) in North Dakota. **Avian diseases**, v. 51, p.649-655; 2007.

GOLDFARB, P.M.; BAKEY, E. Empyema due to *Proteus rettgeri*, report of a case with recovery. **Journal of the Medical Association of the State of Alabama**. n. 21; p.33–37. 1951.

GOMES, S. N.; PESENTI, T. C.; CIRNE, M. P.; MÜLLER, G. Feather mites of *Calidris fuscicollis* (Aves: Scolopacidae) in Brazil. **Brazilian Journal Biology**, v. 75; n. 4; p. 1027-1029. 2015.

GRADON, J.D., CHAPNICK, E.K., LUTWICK, L.I. Infective endocarditis of an aortic valve due to *Acinetobacter*: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**. v.14; 1145–1148.1992.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Revised Ambler classification of β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 10; p. 1050-1051; 2005.

HARRIS, A.; TORRES-VIEIRA, C.; VENKATARAMAN, L.; DeGIROLAMI, P.; SAMORE, M.; CARMELI, Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.28; p. 1128-1133; 1999.

HEDENSTRÖM, A.; ALERSTAM, T. Climbing performance of migratory birds as a basis for estimating limits for flight-carrying capacity and muscle work. **Journal of experimental Biology**. v.164; p. 19-38; 1992.

HIDASI, H. W.; NETO, J. H.; MORAES, D. M. C.; LINHARES, G. F. C.; JAYME, V. S.; Andrade M. A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots Seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44; n.1; p. 1-7; 2013.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65; n. 6; p. 1119-1125, 2010.

ICMBio. Relatório anual de rotas aéreas de concentração de aves migratórias no Brasil. Cabedelo, PB: CEMAVE/ICMBio. 2014. Disponível em <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/Miolo->

Relatorio-Rotas-Migratorias 10-02-2015 Corrigido.pdf.> Acesso em 08 de junho de 2018.

ICMBio. Relatório anual de rotas aéreas de concentração de aves migratórias no Brasil. Cabedelo, PB: CEMAVE/ICMBio. 2016. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/Miolo-Relatorio-Rotas-Migratorias_10-02-2015_Corrigido.pdf> Acesso em 15 de junho de 2018.

INFRAMED. Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos. 9ª ed. Lisboa, 2011.

JACOBY, G. A. AmpC B-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 22, n. 1, p. 161-986. 2009.

JAURIN, B., and S. NORMARK. Insertion of IS2 creates a novel *ampC* promoter in *Escherichia coli*. **Cell Press.** n.32; p.809-816. 1983.

KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews Microbiology.** v.2. p. 123-140. 2004.

KATZUNG, B.; Farmacologia Básica e Clínica. 10ª ed. Brasil: **Mac Graw Hill**, 2007.

KINSKA, D.L. GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; 1000 PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology.** 7ª ed. Washinton DC: Americam Society for Microbiology. p. 517-525. 1999.

KNÖBL T., GODOY S.N., MATUSHIMA E.R., GUIMARÃES M.B. & Ferreira A.J.P. 2008. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science.** n.45; p.54-60.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRAMERY, V.; ANTAI, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection.** v. 11; n. 6; p.315-317. 1983.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D., JANDA, W. M., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P. & WOODS, G. As *Enterobacteriaceae*. In: **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas colorido.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 209-243. 2012.

KONEMMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnostico Microbiológico.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2001.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 43, n. 4, p. 430-444. 2010.

LALUCAT, J.; BENNASAR, A.; BOSCH, R.; GARCIA-VALDES, E.; PALLERONI, N.J. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. **Microbiology Molecular Biology Reviews.** n.70, p.510-54. 2006

LARRAZÁBAL, M. E.; AZEVEDO-JÚNIOR, S. M.; PENA, O. Monitoramento de aves limícolas na Salina Diamante Branco, Galinhos, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, n:19, p: 1081-1089, 2002.

LAVAGNOLI, S.L, BASSETTI, B.R, KAISER, T. D. L., KUTZ, K.M., CERUTTI, C. Jr. Factors associated with acquisition of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. 2017.

LEE, N.Y., CHANG, T.C., Wu, C.J., CHANG, C.M., LEE, H.C., CHEN, P.L., LEE, C.C., Ko, N.Y., Ko, W.C. Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia. **Journal Infection**; n. 61; p. 219–227. 2010.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**. v.14, n.1; p. 3-10. 2008.

MCINROY, J.A; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**. v.173; p. 337-42.1995.

MADDISON, J. E.; PAGE, S. W.; CHURCH, D. B. Farmacologia clínica de pequenos animais. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.

MALHOTRA, S.; SINGH, K. *Pseudomonas stutzeri* associated with conjunctivitis. **Indian Journal Pathology Microbiology**. v.51. ed. 4, p.572. 2008.

MANOS, J.; BELAS, R.; The Prokaryotes. ; The genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*; **New York, NY: Springer**; p. 585–606. 2006

MARDANEH, J.; DALLAL, M.M.S.; Isolation and Identification *Enterobacter asburiae* from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). **Acta Medica Iranica**. V.54; n. 1; 2016.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution, Amsterdam**. v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTÍNEZ, R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **International Microbiology**. v. 7 p.261 -268. 2004.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, p. 4-9, 2014.

MARTINS, A. C.; PICOLI, S. U. Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 421-426. 2011.

MARTINS-LOURERO, M.; MORAES, B. A.; MENDONÇA, V. L.; ROCHA-QUASRA, M. R.; SANTOS-PINHEIRO, G.; DUTRA-ASENSI, M. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase isolated for neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Latino Americana de Microbiologia**. v.43. 2ª ed. p.88-95. 2001.

MATIAS, C.A.R.; PEREIRA, I.A.; ARAÚJO, M.S.; SANTOS, A.F.M.; LOPES, R.P.; CHRISTAKIS, S.; RODRIGUES, D.P.; SICILIANO, S. Characteristics of *Salmonella* spp. Isolated from Wild Birds Confiscated in Illegal Trade Markets, Rio de Janeiro, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-7. 2015.

MATTHEW, M. (1979). Plasmid-mediated β -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**. v. 5, p.349-358. 1979.

MICHAUD, Guy; FERRON, J.. Sélection des proies par quatre espèces d'oiseaux limicoles (Charadrii) de passage dans l'estuaire du Saint-Laurent lors de la migration vers le sud. **Canadian Journal Of Zoology**, [s.l.], v. 68, n. 6, p.1154-1162, jun. 1990.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brasil. **Antimicrobial Agents and chemostherapy**. V. 53. n. 1. p.333-334. 2009.

MORRISON, R.G. Migration system of some new world shorebirds, p.125-202. In: J.BURGER & B.L.OLLA (Eds). Behavior of marine animais. Shorebirds: migration and fargins behavior. **New York Plenum Press**, vol. 6, 743 p.1984.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n. 403; p. 853-858. 2000.

NEMEC, A., DIJKSHOORN, L., CLEENWERCK, I.; BAERE, T., JANSSENS, D., VAN DER REIJDEN, T.J., JEZEK, P., VANECHOUTTE, M. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a smallcolony-forming species isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology** n. 53; p. 1563–1567. 2003.

NEMEC, A., KRIZOVA, L., MAIXNEROVA, M., VAN DER REIJDEN, T.J.K., DESCHAGHT, P., PASSET, V., VANECHOUTTE, M., BRISSE, S., DIJKSHOORN, L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*A. baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Reseach Microbiology**. n. 162; p. 393–404. 2011.

O'HARA, C. M. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and others aerobic gran-negative bacilli. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p. 147-162, 2005.

O'HARA, C.M.; BRENNER, F.W.; MILLER, J.M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical Microbiology Reviews**. n. 13, v. 4; p.534–46. 2000.

OLIVEIRA, W. F.; CARDOSO, W. M.; MARQUES, L. C. L.; SALLES, R. P. R.; AGUIAR FILHO, J. L. C.; TEIXEIRA, R. S. C.; ROMÃO, J. M.; LIMA, A.C. P. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos procedentes de explorações industriais do Estado do

Ceará, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 99, n. 552, p.211-214. 2004.

PATERSON, D. L., BONOMO, R. A. "Extended-spectrum β -lactamases: clinical update". **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p. 657-686, 2005.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M., LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents chemotherapy**. V. 53, n.6. 2003.

PEREZ, F., ENDIMIANI, A., HUJER, K. M., BONOMO, R. A. The continuing challenge of ESBLs. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 7; n. 5; p.459-469. 2007.

PETRI, W. A. JR. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos betalactâmicos. In: GOODMAN & GILMAN (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11^a Ed, p. 1013-1036, 2007.

PFALLER, M. A.; SEGRET, J. Overview of the epidemiological profile and Laboratory detection on extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Infectious Diseases**. v. 42. 2006.

PICCIRILLO, A.; MAZZARIOL, S.; CALIARI, D.; MENANDRO M.L. Salmonella Typhimurium phage type DT160 infection in two moluccan cockatoos (*Cacatuamoluccensis*): clinical presentation and pathology. **Avian Diseases**, v.54, n.1, p.131-135, 2010.

PIERSMA, T; VAN GILS, J; WIERMA, P. **Family Scolopacidae (sandpipers, snipes and phalaropes)**. Handbook of the Birds of the World. Hoatzin to Auks. editor / J. del HOYO ; A. ELLIOTT ; J. Sargatal. Barcelona: **Lynx Edicions**. v.3 p. 444-533. 1996.

PODSCHUM, R.; ULMANN, N. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens; epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Review**. n.11, p.589-603, 1998.

POLLACK, M. Pseudomonas aeruginosa. In: MANDELL, G. L; BERNNETT, J. E; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 5. ed. New York: Churchill Livingstone, 2000.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. Genus Salmonella. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. New York: **Springer Science Business Media Inc.**v.2; p. 764-799. 2005.

QUEIROZ, G. M.; SILVA, L. M.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, 2012.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M. E.; DONN & ELLY, N.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1^a ed. Porto Alegre: editora Artmed. 512 p. 2005.

RODRIGUES, A. A. F. Priority Areas for Conservation of Migratory And Resident Waterbirds on the Coast of Brazilian Amazônia. **Revista Brasileira de Ornitologia** v.15, n.2, p. 209-218. 2007.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu. 118p. 2005.

SADER, H. S. "Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies". **Brazilian Journal Infectious Disease**. v.4; n. 2; p. 91-99, 2000.

SERRANO, I.L. **Distribuição e conservação de aves migratórias neárticas da ordem Charadriiformes (famílias Charadriidae e Scolopacidae) no Brasil**. [Tese doutorado em Zoologia] Universidade Federal do Pará. 2010.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Research in Microbiology**, v.155, p. 409-421, 2004.

SIBLEY, C. G.; AHLQUIST, J.E. Phylogeny and Classification of the Birds- A Study in Molecular Evolution. **Yale University**, USA. 976p.1990.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Edição revista e ampliada por José Pacheco. Rio de Janeiro. Ed. Nova Fronteira, 912p. 1997.

SICK, Helmut; **Ornitologia Brasileira**; 4ª Imp. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, 2001.

SILVA, P. Antibióticos Beta-lactâmicos. Penicilinas. In: Penildo Silva (Org.). **Farmacologia**, 7ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

SIROT, D.; SIROT, J.; LABIA, R. I; MORAND, P.; COURVALIN, A.; DARFEUILLE-MICHAUD, R.; PERROUX, R.; CLUZEL, R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 20, p. 323-334. 1987.

SOARES, V. M. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial**. v. 48. n. 4. p. 251-253. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442012000400003> Acesso em 31 de maio de 2018.

SOUSA JR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Betalactamases de espectro ampliado: um importante mecanismo de resistência bacteriana no laboratório clínico. **NewsLab**. v. 63, p.152-74. 2004.

STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology**. v. 43; n. 2; p.159-271. 1966.

STÜRENBERG, E.; MACK, D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **The Journal of Infection**. n. 47. v. 4; p. 47:273-95. 2003.

TADA, T.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; DAHAI, R.K et al. NDM-1 Metallo-beta-Lactamase and ArmA 16S rRNA methylase producing *Providencia rettgeri* clinical isolates in Nepal. **BMC Infectious Diseases**. n. 14; v.56. 2014

TAKEKAWA, J. Y et al. Field detection of avian influenza virus in wild birds: evaluation of portable rRT-PCR sytem and frreze-dried reagents. **Journal of Virological Methods**. v. 166, n. 1-2, p. 92-7. 2010.

TASHIRO Y, UCHIYAMA H, NOMURA N. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**. v. 14, n. 6, p. 1349-1362. 2012.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

TOSIN, I. **Avaliação do modo de disseminação da resistência bacteriana a antibacterianos nos hospitais brasileiros**. [Tese de Doutorado Curso de Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias]. Universidade Federal de São Paulo: [s. n.], 137p. 2001.

TRAUB, W.H.; CRADDOCK, M.E.; RAYMOND, E.A.; FOX, M.; MCCALL, C.E. Characterization of an Unusual Strain of *Proteus Rettgeri* Associated With An Outbreak Of Nosocomial Urinary-Tract Infection. **Applied Microbiology**. n. 22; p.278–283. 1971.

TUNCA, R.; TOPLU, N.; KURKAN, S.; AVCI, H.; AYDOGAN, A.; EPIKMEN, E.T.; TEKBIKYIK, S. Pathomorphological, immunohistochemical and bacteriological findings in budgerigars (*Melopsittacusundulatus*) naturally infected with *S. Gallinarum*. **Avian Pathology**, v.41, n.2, p.203-209, 2012.

TZOUVELEKIS, L. S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PSICHOGIOU, M.; TASSIOS, P. T.; DAIKOS, G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 682-707, 2012.

UMED, O. **Klebsiella Infections**. Microbiology Gulbarga University. 2002. Disponível em: <http://medicineinstantaccesstotheminds of medicine>. Acesso em 27 de maio de 2018.

VIEIRA, F. J. **Deteção e caracterização dos primeiros casos de enterobactérias produtoras de NDM-1 no Brasil**. In: Salão de Iniciação Científica da Universidade do Rio Grande do Sul, 25, Porto Alegre, 2013.

VIGO, G.B.; ORIGLIA, J.; GORNATTI, D.; PISCOPO, M.; SALVE, A.; CAFFER, M.I.; PICHEL, M.; BINSZTEIN, N.; LEOTTA, G.A. Isolation of *Salmonella Typhimurium* from dead blue and gold macaws (*Araararauna*). **Avian Diseases**, v.53, n.1, p.135-138, 2009.

WASHINGTON JUNIOR, C. W. **Koneman's Color Atlasand Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6. Ed. United States of America: Lippincott Williams na Wilkins, 2006.

WASHINGTON, M.A.; BARNHILL, J.; GRIFFIN, J.M. A Case of Wound Infection with *Providencia rettgeri* and Coincident Gout in Patient from Guam. **Hawaii Journal of Medicine & Public Health**. n. 74; v. 11.p. 375-377. 2015.

WHO (World Health Organization). **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 10 de junho de 2018.

WILLCOX, M. D. *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contactlens wear: a review. **Optometry and Vision Science**. v. 84, n. 4, p. 273-278. 2007.

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS DE AVES MIGRATÓRIAS NO LITORAL PARAIBANO

Resumo

A migração é um comportamento biológico de várias espécies de aves e que pode favorecer a disseminação de microrganismos patogênicos através de longas distâncias, colocando em risco populações de outras espécies de aves, mamíferos, incluindo o homem. Muitos destes microrganismos podem ser resistentes a alguns tipos de antibióticos, sendo uma ameaça à saúde pública. Objetivou-se com este estudo, isolar, caracterizar e avaliar o perfil de resistência de enterobactérias encontradas em espécies de maçaricos no período de internada na Paraíba. Foram coletadas amostras cloacais das espécies *Arenaria interpres*, *Calidris pusilla*, *Charadrius semipalmatus* e *Tringa flavipes*. Foram isoladas 47 cepas de 14 gêneros bacterianos distintos para os quais foram testados 12 antibióticos; para o teste de suscetibilidade *in vitro* através do método Disco-difusão o maior índice de resistência (68,8%) foi observado para todos os gêneros frente ao amoxicilina+ácido clavulânico, seguido por cefoxitina (63,8%) e ampicilina (63,8%); Das cepas bacterianas que apresentaram halo fantasma, 6 (12,76%) cepas foram resistentes ao aztreonam, 1 (2,12%) foram resistentes a ceftazidima, 1 (2,12%) para cefoxitina, e 1 (2,12%) resistentes a Cefotaxima. Portanto, é importante o monitoramento de aves silvestres, pois estas são potenciais reservatórios de microrganismos patogênicos, com isso, auxiliam na disseminação de resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae; migração; aves limícolas; resistência bacteriana.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ENTEROBACTERIA OF MIGRATORY BIRDS IN THE PARAIBANO COAST

ABSTRACT

Migration is a biological behavior of several bird species and may favor the spread of pathogenic microorganisms over long distances, putting populations of other species of birds, mammals, including humans at risk. Many of these microorganisms may be resistant to some types of antibiotics and pose a threat to public health. The objective of this study was to isolate, characterize and evaluate the resistance profile of enterobacteria found in species of tortoises in the wintering season in Paraíba. Cloacal samples of the species *Arenaria interpres*, *Calidris pusilla*, *Charadrius semipalmatus* and *Tringa flavipes* were collected. Seventeen strains were isolated from 14 different bacterial genera for which 12 antibiotics were tested; (68.8%) was observed for all genres against amoxicillin + clavulanic acid, followed by cefoxitin (63.8%) and ampicillin (63,8%); Of the bacterial strains that presented phantom halo, 6 (12.76%) strains were resistant to aztreonam, 1 (2.12%) were resistant to ceftazidime, 1 (2.12%) to cefoxitin, and 1 (2.12%) resistant to Cefotaxime. Therefore, it is important to monitor wild birds, as these are potential reservoirs of pathogenic microorganisms, thereby helping to disseminate antimicrobial resistance.

Keywords: Enterobacteriaceae; migration; waders; Bacterial resistance.

INTRODUÇÃO

A migração é um comportamento biológico que ocorre sazonalmente, em vários grupos animais, são movimentos direcionais em massa de um grande número de indivíduos de uma determinada espécie, na qual populações realizam deslocamentos de forma cíclica e sazonal, geralmente associados a fatores alimentares e reprodutivos necessários ao ciclo de vida desses animais (BEGON et al., 1990; MORRISON, 1984 & ALERSTAM et al., 2003).

Periodicamente, os Charadriiformes migram para a costa sul-americana durante o inverno, chegando a realizar rotas de 12.000 a 25.000 km entre os sítios reprodutivos e os de invernada e passam a maior parte do tempo nos sítios de repouso, se alimentando e descansando a fim de acumular reservas para a próxima etapa de voo (MYERS, et al., 1987). Milhares destas aves limícolas vem do hemisfério Norte, migram para América do Sul, com a proximidade do inverno boreal, ocupando principalmente as costas marítimas do continente, no período de setembro a abril, onde vivem a maior parte do seu ciclo de vida (HARRINGTON & MORRISON, 1979; HARRINGTON et al., 1986; AZEVEDO-JÚNIOR & LARRAZÁBAL, 1999, AZEVEDO-JÚNIOR et al., 2001a; TELINO-JÚNIOR et al., 2003).

O comportamento migratório dessas aves pode favorecer a disseminação de patógenos através de longas distâncias, colocando em risco populações de outras espécies de aves (de vida livre ou cativeiro) e mamíferos, incluindo humanos por vários países (TAKEKAMA et al., 2010).

Dentre esses patógenos, se encontram os membros da família Enterobacteriaceae que têm como reservatório o intestino do homem e animais e podem causar infecções intestinais e extra intestinais em aves imunocomprometidas (CORRÊA et al., 2013). Nesse aspecto, estas aves podem ser afetadas por bactérias oportunistas como *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp* e *Citrobacter spp* (GERLACH, 1994), *Escherichia coli* (CORRÊA et al., 2013; KNOBL et al., 2011), *Salmonella spp* (VIGO et al., 2009; PICCIRILLO et al., 2010; TUNCA et al., 2012).

Para o combate de muitas dessas infecções bacterianas, o uso de antibióticos diminui as taxas de morbidade e mortalidade. Contudo, além da transmissão desses agentes patógenos entre homens e animais, outra preocupação a ser considerada é a transmissão de importantes fatores de resistência pelo o mau uso desses fármacos, acelerando o processo natural de resistência das bactérias contra os antibióticos. Estudos realizados em psitacídeos mostram que manter essas aves podem albergar inúmeras bactérias que apresentam resistência a diversas classes de antimicrobianos (HIDASI et al., 2013; CORRÊA et al., 2013; MATIAS et al., 2015; COSTA, 2017).

A resistência bacteriana a antimicrobianos tem sido um problema crescente referente e às doenças em animais e humanos e assunto frequentemente instiga um debate sobre a teoria que, a exposição aos antimicrobianos exerceria pressão de seleção para bactérias resistentes às drogas, aumentando desta forma a quantidade de bactérias multirresistentes encontradas na clínica veterinária e humana (GIBBS et al., 2007). Diante destas informações e a escassez de estudos sobre a microbiota de aves migratórias (maçaricos) faz-se necessários estudos como o nosso que teve como objetivo avaliar a resistência antimicrobiana de aves migratórias no litoral paraibano.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O estudo foi realizado na Ilha da Restinga, localizada no município de Cabedelo, litoral do Estado da Paraíba (07°03'47,5"S e 34°51'14,5"W) a cerca de 11 km da cidade de João Pessoa (Figura 4). A área de estudo compreende uma ilha fluviomarinha localizada junto à desembocadura do rio Paraíba. Possui uma área de aproximadamente 6km², predominantemente coberta de manguezais e resquícios de Mata Atlântica de restinga e contém pastagens com arbustos a vegetação de mangue, encontrada na região de inundação, e mata atlântica, na região de topografia mais elevada.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para uso de Animais na Universidade Federal da Paraíba e registrada sob o protocolo nº172/2015, a autorização para a realização do estudo foi concedido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), arquivados sob o protocolo 47023-1.

Figura 4. Localização da área de estudo na Paraíba.



Fonte: Google, 2018.

Captura das aves

As coletas foram realizadas nos meses de outubro de 2016 e abril de 2017. Esse período representa o período em que as aves retornam aos locais de

reprodução, o momento de chegada das aves migratórias advindas do hemisfério Norte e metade de sua invernada na América do Sul.

As coletas aconteceram durante dois dias em cada período dos meses citados, para a captura das aves foram utilizadas redes de neblina (12 x 2,5m) (Figura 5), com malha de 36 mm, instaladas nos locais de pouso das aves. Após a retirada da rede as aves eram trazidas para o acampamento e colocadas em gaiolas de manutenção até o começo da coleta das amostras.

Figura 5. Rede de neblina montada no local de captura das aves.



Fonte: Silva, 2016.

Foram capturadas um total de 71 aves nas duas coletas realizadas, destas, cinco espécies de aves migratórias foram capturadas o *Limnodromus griseus*, *Charadrius semipalmatus*, *Calidris pusilla*, *Arenaria interpres* e *Tringa flavipes*, sendo a espécie *Calidris pusilla* a mais abundante na área, este número dependeu da disponibilidade de aves que caíam nas redes de neblina instaladas no local, no período das coletas.

Coleta das amostras

Foram coletadas amostras cloacais individuais de cada ave através de *swab* estéril (Figura 6) e colocadas em meio de transporte Stuart sendo imediatamente acondicionadas sob refrigeração.

Figura 6. Coleta com swab.

Fonte: Silva, 2017.

Na (Tabela 1) estão descritas as espécies de maçaricos dos quais o material foi coletado, após as coletas as aves foram marcadas com anilhas fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa para conservação das Aves - Cemave/ICMBio e foram devolvidas ao seu habitat natural.

Tabela1. Relação das espécies de Charidriiformes e Scolopacidae (maçaricos).

| Família/Espécie | Nome comum | Positivas (n) | % | Negativas (n) | % |
|---|---------------------------------|---------------|-------|---------------|-------|
| Charidriidae | | | | | |
| <i>Charadrius semipalmatus</i> (Bonaparte, 1825). | Batuíra-de-bando | 05 | 7,04 | - | - |
| Scolopacidae | | | | | |
| <i>Arenaria interpres</i> (Linnaeus, 1766). | Vira-pedras | 09 | 12,67 | 02 | 2,81 |
| <i>Calidris pusilla</i> (Linnaeus, 1766). | Maçarico-rasteirinho | 32 | 45,07 | 16 | 22,53 |
| <i>Tringa semipalmata</i> (Gmelin, 1789). | Maçarico-asa-branca | - | | 01 | 1,40 |
| <i>Limnodrumus griseus</i> (Gmelin, 1789). | Maçarico-costas-brancas | - | - | 05 | 7,04 |
| <i>Tringa flavipes</i> (Gmelin, 1789). | Maçarico - de - perna – amarela | 01 | 1,40 | - | - |
| Total | | 47 | 66,2 | 24 | 33,8 |

*Não foram encontrados achados microbiológicos em 33,8% das amostras coletados

Processamento das amostras

As amostras foram analisadas no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA) no Centro de Ciências Agrárias na Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, para teste de MALDI-TOF foi realizado na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Isolamento e identificação fenotípica

Visando a pesquisa de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, os suabes foram inicialmente inoculados em caldo BHI (Brain and heart infusion broth) com incubação a 37°C por 24 horas. As amostras também foram semeadas em MacConkey, com incubação em estufa bacteriológica a 37°C, as leituras foram feitas em 24, 48 e 72 horas. As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com característica macro e microscópicas bem como por provas bioquímicas conforme descrito por Farmer (1999), nos testes bioquímicos foram utilizados o ágar tríplice açúcar ferro (TSI), meio de ureia de Christensen, mobilidade/indol/ornitina (MIO), ágar lisina ferro (LIA), citrato de Simmons. Os mecanismos de identificação de cada uma das prova e esquema de identificação são capazes de identificar 90% das enterobactérias foi conforme Santos Filho (2006).

Testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro*

O teste de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* de 47 isolados foi de acordo como Kirby-Bauer (1966) frente a diferentes antimicrobianos, a saber: gentamicina (GEN-120 µg), cefotaxima (CTX-30 µg), ampicilina (AMP-10 µg), ciprofloxacina (CIP-10 µg), amoxicilina+ ácido clavulânico (AMC-20/10 µg), ceftazidima (CAZ-30 µg), clorafenicol (CLO-30 µg), cefoxitina (CFO -30 µg), sulfametoxazol/trimetoprim, (SUT-1,25/23,75 µg), tetraciclina (TET-30 µg), Imipenem (IPM-10 µg) e aztreonam (ATM-30 µg). A interpretação dos testes pela medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento do microrganismo. As concentrações, bem como o critério de interpretação, foram conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) descrito na tabela 2.

De início, as culturas foram semeadas em placas de ágar MacConkey, de modo que 569 fossem obtidas colônias isoladas, e incubadas em estufa bacteriológica à 37 ± 2 °C. Após 570 24h de incubação, 2 a 3 colônias do cultivo

foram ressuspensas em soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) em tubo, de forma a obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL). A confirmação da turbidez foi mensurada com o auxílio de um turbidímetro. Em seguida, um suabe estéril foi imerso na suspensão bacteriana, eliminando-se o excesso do inóculo por meio de uma compressão do mesmo na parede do tubo. Em placas de Petri, com dimensões 140x15 mm, contendo ágar Mueller Hinton (Difco®, EUA), foram semeadas por estriamento ao longo de três planos distintos (rotações de 60°) em toda a superfície do ágar de modo a obter um crescimento uniforme. Com espera de aproximadamente 5 minutos para eficaz absorção do inóculo no ágar, procedeu-se a aplicação dos discos de antimicrobianos com distribuição dos mesmos a uma distância de 24 mm os mesmos. Por fim as placas foram incubadas a 37 ± 2°C por um período de 24h e foram realizadas leituras dos halos de inibição formados pelos antimicrobianos.

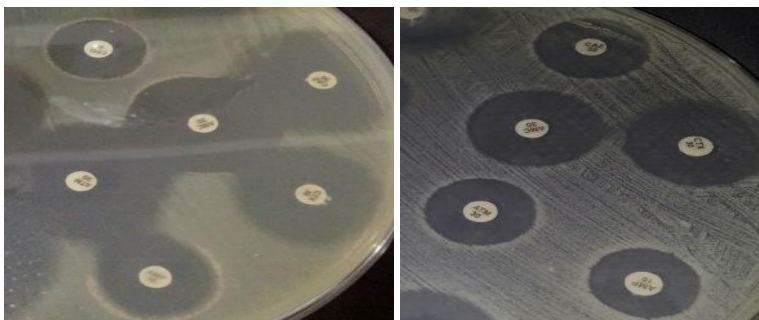
Tabela 2. Valores de halos inibitórios esperados para Enterobacteriaceae.

| Antimicrobianos | Halo de inibição (mm) | | | |
|-----------------|-----------------------|----------|---------------|------------|
| | Discos | Sensível | Intermediário | Resistente |
| AMC | 20/10µg | ≥ 18 | 14 – 17 | ≤13 |
| AMP | 10µg | ≥ 17 | 14 -16 | ≤ 13 |
| ATM | 30µg | ≥ 21 | 18 – 20 | ≤ 17 |
| CAZ | 30µg | ≥ 21 | 18 – 20 | ≤ 17 |
| CIP | 5µg | ≥ 21 | 16 -20 | ≤ 15 |
| CFO | 30µg | ≥ 18 | 15 – 17 | ≤ 14 |
| CLO | 30µg | ≥ 18 | 13 -17 | ≤ 12 |
| CTX | 30µg | ≥ 26 | 23 – 25 | ≤ 22 |
| GEN | 10µg | ≥ 15 | 13 – 14 | ≤ 12 |
| IPM | 10µg | ≥ 23 | 20 -23 | ≤ 19 |
| SUT | 23,75/1,25µg | ≥ 16 | 11 -15 | ≤ 10 |
| TET | 30µg | ≥ 15 | 12 -14 | ≤ 11 |

AMC – amoxicilina+ ácido clavulânico; AMP – ampicilina; ATM – aztreonam; CAZ – ceftazidima; CFO – cefoxitina; CIP – ciprofloxacina; CLO – clorafenicol; CTX – cefotaxima; GEN – gentamicina; IPM – imipenem; SUT – sulfametoxazol/ trimetoprim; TET – tetraciclina.

Para a confirmação de cepas produtoras de ESBL, foi utilizado o método de aproximação de discos com adição de um disco com ácido clavulânico circuncêntrico aos discos contendo Aztreonam e as cefalosporinas de terceira geração. Foi considerado resultado positivo quando ocorreu aumento do diâmetro do halo de inibição ou o aparecimento da zona fantasma (distorção do halo ao redor do disco β -lactâmico), conforme orientação do CLSI (2015), como controle positivo foi utilizada cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 e como controle negativo a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figura 7).

Figura 7. Teste de aproximação de discos para detecção de ESBL. (A) combinação dos discos para detecção de ESBL e presença de halo fantasma; (B) combinação dos discos sem presença de halo fantasma.



Fonte: Silva, 2017.

Identificação por MALDI-TOF

Dentre as 47 amostras identificadas, dez foram encaminhadas para o laboratório da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG. Estas amostras foram escolhidas dentro as demais por apresentarem halo fantasma na avaliação de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro*, com possível produção de ESBL para confirmação de gênero bacteriano.

As amostras foram previamente preparadas de forma estéril e colocadas em crio tubos com tampa de rosca contendo ágar nutriente.

Identificação dos mecanismos de resistência por PCR

Foi realizada Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para os genes mostrados na tabela 3. O DNA foi extraído por fenol de acordo com (Fritsch et al., 1989). As extrações foram realizadas no Laboratório de Avaliação de Produtos de origem Animal (LAPOA), na Universidade Federal da Paraíba, a PCR foi realizada apenas com os dez isolados que passaram pela identificação por MALDI-TOF. Posteriormente, o DNA bacteriano extraído foi quantificado usando um espectrofotômetro (Colibri, Titertek Berthold, Alemanha).

Para cada reação foram utilizados 100ng do DNA dos isolados estudados para as reações de PCR. As reações de PCR com um volume final igual a 25µl contendo tampão x 1, MgCl₂ 1,5 mM., 10 pM de cada primer, 200 µM de cada dNTPS, 1 U de polimerase Taq (Invitrogen, Brazil) e 1,0 µl de DNA. Na tabela 3 é exposto os iniciadores que foram empregados para amplificação dos isolados. A mistura reacional foi incubada em Termociclador (TPersonal Thermocycler, Biometra®, Alemanha) com as condições de termociclagem (Tabela 3).

Tabela 3. Detalhes dos *primers* utilizados e as condições de termociclagem.

| Gene | Sequência | Amplicon (pb) | Condições de termociclagem* | Controles positivos | Referências |
|---------|---|---------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| CTX-M | F: SCSATGTGCAGYACCAAGTAA R: CCGCRATATGRTTGTTGGTG | 554 | 1 | Klebsiella pneumoniae ATCC 70060 | Liu et al., 2015 |
| CTX-M-1 | F: AAATCACTGCGYCAGTTCA R: GGTGACGATTTTAGCCGCCG | 854 | 2 | Escherichia coli | Dropa et al., 2015 |
| CTX-M-2 | F: GACTCAGAGCATTGCGCCGC R: TCAGAAACCGYGGGTTACGA | 870 | 2 | Escherichia coli | Dropa et al., 2015 |
| CTX-M-8 | F: GATGAGACATCGCGTTAAG R: GGTGACGATTTTCGCGGCA | 861 | 2 | Escherichia coli | Dropa et al., 2015 |
| MCR-1 | F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCCAT | 343 | 3 | Escherichia coli | Liu et al., 2015 |
| ACC | F: AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA R: TTCGCCGCAATCATCCCTAGC | 346 | 4 | hafnia alvei (ACC- 1) | Pérez-Pérez e Hanson, 2002 |
| FOX | F: AACATGGGGTATCAGGGAGATG R: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG | 190 | 4 | Escherichia coli 200 | Pérez-Pérez e Hanson, 2002 |
| MOX | F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCCAT | 520 | 4 | Não possui controle | Pérez-Pérez e Hanson, 2002 |
| CMY-2 | F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC | 462 | 4 | Não possui controle | Pérez-Pérez e Hanson, 2002 |
| NDM | F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC | 621 | 5 | Klebsiella pneumoniae (C262) | Poirel et al., 2011 |

*1 = 94°C 3 min; 35 ciclos de 94°C 30 seg, 55° 30 seg, 72°C 45 seg; e 72°C 5 min. 2 = 94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C 45 seg, 60°C 1 min, 72°C 1 min; e 72°C 10 min. 3 = 94°C 15 min; 25 ciclos de 94° C 30 seg, 59°C 90 seg, 72°C 60 seg; 72°C 10 min. 4 = 94°C 3 min, 25 ciclos de 94°C 30 seg, 64°C 30 seg, 72°C 1 min; e 72°C 7 min. 5 = 94°C 10 min; 36 ciclos de 94°C 30 seg, 52°C 40 seg, 72°C 50 seg; e 72°C 5 min.

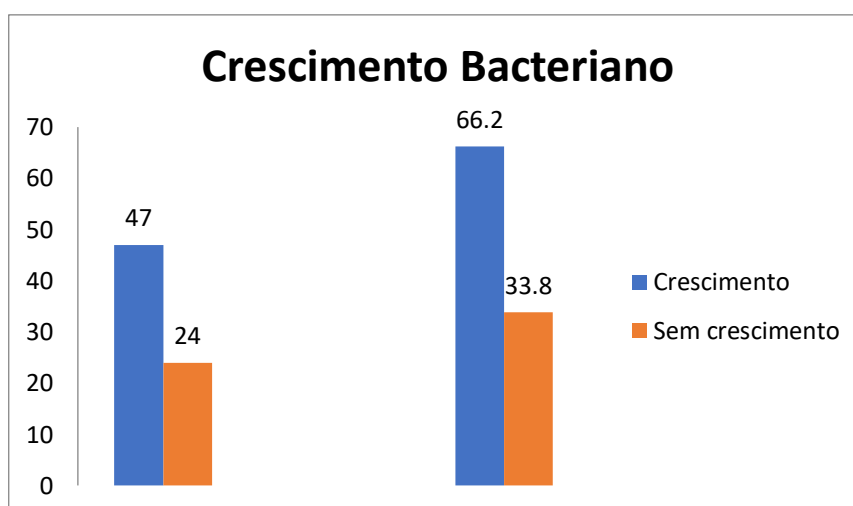
Os *amplicons* foram analisados por intermédio de eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Gel Red (Biotium, EUA) e observados com o auxílio de um transiluminador de UV (Carestream Molecular Imaging Software – Version 5.0, ©Carestream Health, Inc, EUA). O tamanho dos fragmentos amplificados fora analisado por comparação com um padrão de massa molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil).

RESULTADOS

Isolamento e identificação fenotípica das enterobactérias

Este estudo analisou um total de 71 amostras de swabs cloacais das aves migratórias (maçaricos) capturadas na Ilha da Restinga em Cabelo-Paraíba. Dentre as 71 amostras houve um crescimento de microrganismos em 66,2% das amostras (n=47), sendo 33,8% (n=24) negativa para presença dos mesmos.

Gráfico 1. Resultado geral do exame microbiológico de swabs cloacais das aves capturadas considerando ausência ou presença de crescimento de microrganismo no total de 71 amostras - Paraíba- 2018.



Foram identificados 14 gêneros bacterianos pelo método de testes bioquímicos e Maldi-Tof, são eles: *Acinetobacter parvus*, *Edwardsiella spp*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Hafnia spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Providencia rettgeri*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*.

Na Tabela 4 são apresentados os gêneros das enterobactérias encontradas de acordo com a espécie da ave, o maior número de enterobactérias isoladas aconteceu na espécie *Calidris pusilla* com 32 isolados, em relação ao gênero de bactérias isoladas a espécie mais encontrada nos isolados foi a *Enterobacter spp* 23,40% (n= 11), a *Pseudomonas spp* com 21,27% (n= 10) e a *Escherichia coli* 14,89% (n= 7).

Tabela 4. Agentes bacterianos isolados em amostras de *swabs* cloacais de espécies de maçaricos na Ilha da Restinga em Cabelo na Paraíba.

| Relação de gêneros e espécie de bactérias isoladas | Relação maçaricos/ bactérias | | | | | | | |
|--|------------------------------|-------|-------------------------|-------|--------------------------------|------|------------------------|------|
| | <i>Arenaria interpres</i> | | <i>Calidris pusilla</i> | | <i>Charadrius semipalmatus</i> | | <i>Tringa flavipes</i> | |
| | * (n=9) | | * (n=32) | | * (n=5) | | * (n=1) | |
| | n | % | n | % | n | % | N | % |
| <i>Acinetobacter parvus</i> | - | - | - | - | 1 | 1,40 | - | - |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | - | - | 1 | 1,40 | - | - | - | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | - | - | 2 | 2,81 | 2 | 2,81 | - | - |
| <i>Enterobacter spp</i> | 4 | 5,63 | 6 | 8,45 | 1 | 1,40 | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 2 | 2,81 | 4 | 5,63 | - | - | 1 | 1,40 |
| <i>Edwardsiella spp</i> | - | - | 1 | 1,40 | - | - | - | - |
| <i>Hafnia spp</i> | - | - | 1 | 1,40 | - | - | - | - |
| <i>Klebsiella spp</i> | 1 | 1,40 | - | 1,40 | 1 | 1,40 | | |
| <i>Salmonella spp</i> | | - | 1 | 1,40 | - | - | - | - |
| <i>Shigella spp</i> | - | - | 4 | 5,63 | - | - | - | - |
| <i>Providencia rettgeri</i> | - | - | 1 | 1,40 | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | 1 | 1,40 | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas spp</i> | 1 | 1,40 | 9 | 12,67 | - | | - | - |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 1 | 1,40 | 1 | 1,40 | - | - | - | - |
| Total | 9 | 12,67 | 32 | 45,07 | 5 | 7,04 | 1 | 1,40 |

*Os números dizem respeito ao número de aves capturadas.

Tabela 5. Frequência absoluta do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos apresentados pelas cepas isoladas.

| Antibióticos | | AMC | | AMP | | ATM | | CAZ | | CFO | | CIP | | CLO | | CTX | | GEN | | IPM | | SUT | | TET | |
|---------------------|------------------------------------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|---|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|
| | | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % |
| Gêneros Bacterianos | <i>Acinetobacter parvus</i> n= 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Enterobacter asburiae</i> n= 1 | - | - | - | - | 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> n= 4 | 3 | 75 | 3 | 75 | - | - | - | - | 3 | 75 | - | - | 1 | 25 | 2 | 50 | - | - | - | - | 2 | 50 | - | - |
| | <i>Enterobacter spp</i> n= 11 | 8 | 72,7 | 9 | 81,8 | - | - | - | - | 10 | 90,9 | - | - | 1 | 9,1 | 1 | 9,1 | - | - | 2 | 18,2 | - | - | - | - |
| | <i>Escherichia coli</i> n= 7 | 3 | 42,8 | 2 | 28,5 | - | - | - | - | 4 | 57,1 | - | - | 1 | 14,2 | 1 | 14,2 | - | - | - | - | 1 | 14,2 | 1 | 14,2 |
| | <i>Edwardsiella spp</i> n= 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Hafnia spp</i> n= 1 | 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Klebsiella spp</i> n= 2 | 2 | 100 | 2 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 50 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Salmonella spp</i> n= 1 | 1 | 100 | - | - | 1 | 100 | - | - | 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Shigella spp</i> n= 4 | 1 | 25 | 1 | 25 | 3 | 75 | 2 | 50 | - | - | - | - | - | - | 4 | 100 | 1 | 25 | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Providencia rettgeri</i> n= 1 | 1 | 100 | 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 100 | - |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> n= 1 | 1 | 100 | 1 | 100 | - | - | - | - | 1 | 100 | - | - | - | - | 1 | 100 | - | - | - | - | 1 | 100 | 1 | 100 |
| | <i>Pseudomonas spp</i> n= 10 | 10 | 100 | 10 | 100 | - | - | - | - | 9 | 90 | - | - | - | - | 7 | 70 | - | - | - | - | 7 | 70 | 3 | 30 |
| | <i>Pseudomonas stutzeri</i> n= 2 | 1 | 50 | 1 | 50 | - | - | - | - | 1 | 50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | TOTAL n= 47 | 32 | 68,1 | 30 | 63,8 | 5 | 10,6 | 4 | 8,5 | 30 | 63,8 | - | - | 3 | 6,3 | 17 | 36,1 | 1 | 2,1 | 2 | 4,2 | 11 | 23,4 | 6 | 12,7 |

- 0 AMC – amoxicilina/ ácido clavulânico; AMP – ampicilina; ATM – aztreonam; CAZ – ceftazidima; CFO – cefoxitina; CIP – ciprofloxacina; CLO – cloranfenicol;
 1 CTX – cefotaxima; GEN – gentamicina; IPM – imipenem; SUT – sulfametoxazol/ trimetoprim; TET – tetraciclina. R= Resistentes;
 2 % = Porcentagem resistentes.

Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* das cepas isoladas.

Após a identificação das enterobactérias, foi realizado o teste de suscetibilidade *in vitro* através do método Disco-difusão o maior índice de resistência (68,8%) foi observado para todos os gêneros frente ao amoxicilina+ácido clavulânico, seguido por cefoxitina (63,8%) e ampicilina (63,8%). Todos os isolados apresentaram total (100%) sensibilidade ao antibiótico ciprofloxacina, enquanto gentamicina (97,87%), imipenem (95,74%), cloranfenicol (93,62%) e ceftazidima (91,49%) tiveram valores altíssimos de sensibilidade, seguidos pelos antibióticos aztreonam (42) e tetraciclina (41) que tiveram mais de 40 amostras apresentando sensibilidade.

Observou-se que os isolados de *Escherichia* spp. foram sensíveis para os antibióticos ciprofloxacina, aztreonam, ceftazidima, imipenem e gentamicina (100%), sendo algumas amostras resistentes aos antibióticos Cefoxitina (57,14%), a Amoxicilina/Ácido clavulânico (42,86%) e a Ampicilina (28,57%), enquanto apenas uma amostra foi resistente ao cloranfenicol, cefotaxima, sulfametoxazol/ trimetoprim e tetraciclina (14,28%).

Para o gênero *Klebsiella* spp., só foram observadas duas resistências, os dois isolados (100%) foram resistentes ao antibiótico ampicilina e apenas uma amostra (50%) apresentou resistência a cefotaxima.

Para o gênero *Pseudomonas* spp. todos os isolados foram susceptíveis aos antibióticos aztreonam, ceftazidima, ciprofloxacina, cloranfenicol, imipenem e gentamicina (100%); mas, esses isolados apresentaram total eficácia para amoxicilina+ácido clavulânico e ampicilina (100%), enquanto para os antibióticos cefoxitina (90%), cefotaxima (70%) e sulfametoxazol/ trimetoprim (70%) foi observado que mais 6 amostras manifestaram resistência.

A *Shigella* spp. apresentou um perfil de sensibilidade com os antimicrobianos cefoxitina, ciprofloxacina, clorafenicol, imipenem, sulfametoxazol/ trimetoprim, tetraciclina, para todas as amostras (100%); foi expressado resistência a cefotaxima em todos os isolados; o antibiótico aztreonam apresentou resistência em três amostras (75%); duas cepas (50%) tiveram resistência a ceftazidima, enquanto os antibióticos amoxicilina/ ácido clavulânico, ampicilina e gentamicina, só apareceram em um isolado (25%).

No gênero *Enterobacter* spp., foi apresentada sensibilidade para os antibióticos aztreonam, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina em todos os isolados (100%). Foi resistente para a Cefoxitina (90,90%), ampicilina (81,81%), Amoxicilina/Ácido clavulânico (72,72%); ainda, duas amostras (18,18%) apresentaram resistência ao imipenem e uma cepa (9,9%) expressou resistência aos antibióticos cloranfenicol e cefotaxima.

O gênero *Edwardsiella* spp. foi resistente apenas para o antimicrobiano ceftazidima, sendo sensível a todos os demais antibióticos testados.

Para o gênero *Salmonella* spp. os antibióticos que o isolado mostrou resistência foram a amoxicilina/ ácido clavulânico, aztreonam e cefoxitina. Os demais antibióticos foram suscetíveis à mesma.

Para o gênero *Hafnia* spp. que apresentou apenas uma cepa, observou-se resistência a dois antibióticos, a amoxicilina/ácido clavulânico e cefoxitina; e todos os outros foram sensíveis para a mesma.

Foram identificados diversos gêneros bacterianos, como *Acinetobacter parvus* (1) e *Edwardsiella* spp. (1), apresentando resistência apenas a ceftazidima, *Enterobacter asburiae* (1), resistente ao aztreonam, *Hafnia* spp. (1), foi resistente a amoxicilina/ ácido clavulânico e cefotaxima, *Providencia rettgeri* (1), exibiu resistência a amoxicilina/ ácido clavulânico, ampicilina e tetraciclina, *Pseudomonas aeruginosa* (1), expressou resistência aos betalactâmicos, sulfametoxazol/ trimetoprim e a tetraciclina; ainda foram identificados quatro *Enterobacter cloacae* e duas *Pseudomonas stutzeri*, apresentando resistência a β -lactâmicos, sulfametoxazol/ trimetoprim e apenas β -lactâmicos respectivamente.

A tabela 6 apresenta cada um dos gêneros, o número de cepas confirmadas para a produção de ESBL, pelo teste de aproximação ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico dentre as 47 cepas isoladas, assim como as frequências de positividade relativamente aos antimicrobianos utilizados nos quais foi detectado halo fantasma em 6 (12,76%). Das cepas bacterianas que apresentaram halo fantasma, 6 (12,76%) cepas foram resistentes ao aztreonam, 1 (2,12%) foram resistentes a ceftazidima, 1 (2,12%) para cefoxitina, e 1 (2,12%) resistentes a cefotaxima.

Tabela 6. Cepas positivas para o teste fenotípico com possível confirmação de produção de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) de acordo com o gênero e a presença de halo fantasma para cada antimicrobiano usado.

| Gêneros Bacterianos | Antibióticos | | | |
|---------------------------------|--------------|-------------|------------|------------|
| | Aztreonam | Ceftazidima | Cefoxitina | Cefotaxima |
| <i>Acinetobacter parvus</i> n=1 | 1 | 1 | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> n= 5 | 2 | - | - | - |
| <i>Enterobacter spp</i> n=2 | 2 | - | 1 | 1 |
| <i>Providencia rettgeri</i> n=1 | 1 | - | - | - |
| Total de cepas = 6 | | | | |

Foram realizados testes de PCR extração por fenol de acordo com Sambrook et al. (1989) para identificação de cepas resistentes, contudo, não houve resistência e nem produção de ESBL para os *primers* utilizados de acordo com a (Tabela 3).

A multirresistência a três ou mais antibióticos foi observada em 32 (68%) cepas bacterianas, das quais a (*Escherichia coli*) apresentou resistência a sete antimicrobianos (tetraciclina, Sulfametoxazol/trimetropim, cefoxitina, clorafenicol, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina e cefotaxima), (*Enterobacter cloacae*) se mostrou resistente frente a seis antibióticos (sulfametoxazol/trimetropim, cefoxitina, clorafenicol, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina e cefotaxima).

DISCUSSÃO

O Brasil possui uma das mais ricas avifaunas do mundo, com aproximadamente 1700 espécies de aves distribuídas em seu território e cerca de 160 milhões de indivíduos, exercendo crescente pressão sobre o ecossistema naturais e, conseqüentemente, influenciando a fauna e flora do país (GODOY et al., 2010).

De acordo com Simbieda et al., (2011), as aves silvestres podem ser relevantes fontes de microrganismos, enterobactérias capazes de estarem associadas a zoonoses e ao crescimento de doenças infecciosas emergentes .

Bem como em nosso estudo, Foti et al., (2011), em um estudo realizado na comunidade de Ústica, localizada na região da Sicília (Itália) com aves migratórias, detectou enterobactérias através do cultivo de *swabs* fecais de 218 pássaros de vida livre, tendo isolado 183 estirpes bacterianas, sendo *Enterobacter spp* 73 (39,89%), *Escherichia coli* 53 (28,9%), *Klebsiella spp* 9 (4,9%), outros gêneros foram isolados.

Era esperado identificar gêneros que são tidas como normalmente encontrados em aves silvestres, mas igualmente no ambiente e em outros animais; o que foge desse parâmetro é a identificação de diferentes gêneros como foi encontrado no referido estudo, e o mais preocupante, essas bactérias mesmo que com poucos isolados, apresentaram resistências importantes, como a alguns β -lactâmicos. Conseqüentemente o monitoramento de aves silvestres, se bem utilizado, pode ser útil como um parâmetro de avaliação do impacto da pressão antrópica específica de um local, trazendo consigo um melhor entendimento da problemática global da resistência aos antibióticos. Desta forma, deve se atentar para projetos de vigilância orientados para detectar reservatórios de bactérias resistentes a antimicrobianos em aves selvagens (ANTILLES et al., 2014).

No estudo realizado por Pereira e Ueno., (2013), no qual foi avaliado a resistência bacteriana a 5 classes de antibióticos, foi observado resistência a vários antibióticos, incluindo a classe dos β -lactâmicos: amoxicilina, aztreonam, cefoxitina, cefotaxima e imipenem; aos aminoglicosídeos: gentamicina; as quinolonas: norfloxacin; trimetoprim e a tetraciclina. No referido estudo os antimicrobianos que apresentaram maior resistência foram a amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina,

cefotaxima, cefotaxima e sulfametoxazol/ trimetropim; exibindo assim um cenário delicado, pois a resistência a classe dos β -lactâmicos está sendo facilmente disseminada entre diversos gêneros bacterianos.

Segundo Gralha (2011), normalmente é utilizado antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, quando se tem infecções causadas por enterobactérias, sendo as drogas de primeira escolha, devido a sua baixa toxicidade e eficácia terapêutica. No entanto, o uso inadequado e em excesso de tais drogas, proporcionou o surgimento de bactérias com diferentes mecanismos de resistência a essa classe de drogas. A síntetização de enzimas, denominadas β -lactamases, possui o maior destaque mundial, devido a sua eficácia na hidrolização da estrutura dos anéis betalactâmicos, ocasionando a perda do funcionamento do fármaco (BRUNTON et al., 2011; KONG et al., 2010; MARTINS; PICOLI, 2011).

Alroy & Ellis (2011) realizaram uma pesquisa com *Laurus Argentatus* (Gaivota-prateada) sobre resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* no nordeste dos Estados Unidos, os resultados apresentados foram semelhantes ao presente estudo, ainda que a quantidade amostral seja distinta; ambos estudos observaram cepas resistentes a tetraciclina e ampicilina e outras susceptíveis a sulfametoxazol/trimetoprim, gentamicina, ciprofloxacina e clorafenicol.

Em outros estudos realizados por Mesquita e kaiser junto a colaboradores (2016) revelaram ocorrer maior frequência de *Escherichia coli* produtora de ESBL a partir de isolados de origem hospitalar, sendo a *Escherichia coli* e a *Klebsiella pneumoniae* como as espécies mais comumente produtoras de ESBL (COSTA, 2013; GRALHA, 2011; MANA, 2014). Nosso estudo mostrou ser provavelmente positivo para a produção de ESBL (23,4%), através do método fenotípico do Disco-aproximação. Apesar disso, outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos podem estar presentes isoladamente ou ligados a ESBL, interferindo no resultado desses testes (D'AZEVEDO et al., 2004; RICE & BONOMORO, 2007), sugere-se para confirmação dos dados o método genotípico de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (D'AZEVEDO et al., 2004; STÜRENGURG et al., 2003).

Ainda que tenha poucos estudos para comparação, nota-se que a produção de ESBL por enterobactérias em aves silvestres é alarmante e tem crescido a cada dia; em um estudo realizado por Hernandez e colaboradores (2013) que caracterizou

e comparou a produção de genótipos de resistência a β -lactâmicos em uma população de *E. coli* isoladas em gaivotas Franklin e em seres humanos no Chile; apresentou o aumento de bactérias produtoras de ESBL entre essas gaivotas e expressaram uma preocupação com a propagação de genes de resistência independente do hospedeiro, o homem, as aves ou animais em geral.

Ramey e colaboradores (2017), em estudo realizado no Alasca, não foi encontrado nenhum indício para bactérias produtoras de ESBL ou ampC entre as amostras coletadas. É possível que esses resultados estejam relacionados com ações antropogênicas do ambiente ou a falta destas (OSTERBLAD et al., 2001; THALLER et al., 2010) afetando assim a prevalência de bactérias resistentes a antibióticos entre os animais selvagens que habitam uma área.

Contudo, existem cada vez mais evidências de bactérias resistentes sendo identificadas em locais onde não estão administrando antibióticos diretamente nos animais e humanos, presume-se que isso acontece em função de insumos antrópicos (por exemplo, resíduos de antibióticos, biocidas, metais pesados) no meio ambiente (WELLINGTON et al., 2013).

Há uma necessidade da realização de estudos mais abrangentes, envolvendo rotas destas aves migratórias, bem como testes mais precisos para a avaliação da patogenicidade destas aves e a transmissão de doenças, no intuito de prevenir possíveis surtos de doenças relevantes (TSIODORAS et al., 2008).

CONCLUSÕES

A resistência a antimicrobianos tem crescido intensamente nos últimos anos no Brasil e no mundo, esse cenário gera uma necessidade cada vez maior de estudos e esclarecimentos sobre o perfil de sensibilidade das bactérias.

Faz-se necessário mudar comportamentos contemporâneos, como o diagnóstico e a terapêutica; a ocorrência de novos investimentos em pesquisa é igualmente importante, a fim de evitar mecanismos de resistência emergentes.

Mais estudos são necessários para investigar os fatores que impulsionam a aquisição e disseminação de bactérias resistentes na vida selvagem, no meio ambiente, na produção animal e até mesmo dentro de hospitais no intuito de evitar agravantes à saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ANTILLES, N.; GUARCIA-MIGURA, L. JOENSEN, K.G.; LEEKITCHAROENPHON, P.; AARESTRUP, F. M.; CERRDÀ-GUÉLLAR, M.; HENDRIKSEN, S. Audouin's gull, a potential vehicle of an extended spectrum β -lactamase producing *Salmonella* Agona. **FEMS Microbiology Letters**; n. 362; p.1-4.2015.
- ALERSTAM, T., HEDENTRÖM A. A. & ÅKESSON S., Long distance migration: evolution and determinants. **Oikos**. n. 2, v.103, p. 247- 260. 2003.
- ALROY. K. & ELLIS, J. C. Pilot Study of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* in Herring Gulls (*Larus argentatus*) and wastewater in the Northeastern United States. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 1, p.160-63. 2011.
- AZEVEDO-JÚNIOR, S. M. & LARRAZÁBAL, M.E. Captura e anilhamento de *Calidris pusilla* (Scolopacidae) na costa de Pernambuco. **Ararajuba**. Brasília. v.7, n. 2, p. 63-69. 1999.
- AZEVEDO-JÚNIOR, S. M.; DIAS, M. M.; LARRAZÁBAL, M. E.; TELINO-JÚNIOR, W. R.; LYRA-NEVES, R. M. & FERNANDES, C. J. G. Recapturas e recuperações de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil. **Ararajuba**. Brasília. n.9, v.1, p. 33-42. 2001.
- BEGON, M., HAPER, J. L.; TOWNSEND, C. R.; Ecology: individuals, populations and communities. 2º ed. **Blackwell Scientific Publications**. 1990.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 12. Ed. São Paulo: **Artmed**, 2112p. 2011.
- CLSI**. Clinical and Laboratory Standards for Antimicrobiae Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 2015.
- CORRÊA, I.M.; FLORES, F.; SCHNEIDERS, G.H. et al. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. Em psitacídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, p.241-246, 2013.
- COSTA, A. L. P; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência Bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: **Uma breve Revisão de Literatura**. Estação Científica, UNIFAP. v. 7, n. 2, p. 45-57. 2017.
- COSTA, S. I. A. D. **Disseminação horizontal de genes que codificam para betalactamases de espectro alargado em isolados de Enterobacteriaceae de origem hospitalar**. [Tese de Doutorado Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas]- Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa. Portugal. 2013.
- CLSI**. Clinical and Laboratory Standards for Antimicrobiae Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 2015.
- D' AZEVEDO, P.A.; GONÇALVES, A. L. S.; MUSSKOPF, M. I.; RAMOS, C. G.; DIAS, C.A.G. Laboratory Tests in detection of extended spectrum beta-lactamase production. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Screening Test, the E-test, the Double Disk Confirmatory Test, and Cefatoxin

Susceptibility Testing. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 8, n.5, p. 372-377. 2004.

Farmer J.J., III. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 442-458. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, & R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1999.

FOTI, M.; RINALDO, D.; GUERCIO, A.; GIACOPELLO, C.; ALEO, A.; LEO, DE F.; FISICHELLA, V. & MAMMINAC, C.; Pathogenic microorganisms carried by migratory birds passing through the territory of the island. Of Ustica, Sicily (Italy). **Avian Phatology**. v. 40, n. 4, p. 405-409. 2011.

GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. *Avian Medicine: Principles and application* (Eds.). Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida. p.949-983. 1994.

GODOY, S.N.; MATUSHIMA, E. R. A Survey of diseases In passeriforme birds from illegal wildlife in São Paulo city. **Journal of zoo and wildlife Medicine**, v. 31, n. 3, p. 353-360, 2010.

GIBBS, P. S., KASA, R.; NEWBREY, J. L.; PETERMANN, S. R., WOOLWY, R. E.; VINSON, H. M.; REED, W. Identification, antimicrobial resistance profiles, and virulence of numbers from the Family *Enterobacteriaceae* from the feces of yellow-head blackbirds (*xanthocephalus xanthocephalus*) in North Dakota. **Avian diseases**, v. 51, pp.649-655, 2007.

GRALHA, R. E. F. **Métodos de pesquisa de Betalactamases em amostras clínicas – estudo de revisão**. [Tese em Ciências Farmacêuticas]- Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2011.

HARRINGTON, B. A. e R. I. G. Morrison. Semipalmated sandpiper migration in North America. **Studies in Avian Biology**. v.2, p. 83-100. 1979.

HARRINGTON, B.; ANTAS, P. T. Z. & SILVA, F. Observations of Common Terns in South Brazil. **Journal of Field Ornithology**. v.57, n. 3, p.222-224. 1986.

HERNANDEZ, J.; JOHANSSON, A.; STEDT, J. BENGTSSON, S.; PORCZAK, A.; GRANHOLM, S.; GONZÁLEZ-CUÑA, D.; OLSEN, B.; BONNEDAHN, J. DROBNI, M. Characterization and Comparison of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Resistance Genotypes and Population Structure of *Escherichia coli* Isolated from Franklin's Gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and Humans in Chile. **PLOS ONE**. v. 8, n.9, 2013.

HIDASI, H. W.; NETO, J. H.; MORAES, D. M. C.; LINHARES, G. F. C.; JAYME, V. S.; Andrade M. A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots Seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 44, n.1, p. 1-7, 2013.

HURTADO, R.F. **Vigilância epidemiológica do vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia**. 2013. 124f. [Tese Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses] – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

KAISER, T. D. L.; SANTIAGO, D. D.; MENDES, E. M. T.; MATOS, B. V. Detecção de betalactamase de espectro estendido em isolados de enterobactérias provenientes de um hospital da região de Santa Teresa-ES. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**. v. 20, n. 1, p. 3-7. 2016.

KONG, K. F.; SCHENEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n.1, p. 1-36. 2010.

KNÖBL, T.; SAIDENBERG, A. B.S.; MORENO, A.M.; GOMES, T. A.T.; VIEIRA, M.A.M.; LEITE, D.S.; BLANCO, J.E.; FERREIRA, A.J.P. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 10, p. 916-921, 2011.

MANA, M.; BOSSANI, N.; ROMANELLI, S.; SVIDZINSK, T. I. E.; LEMES, R. M. L. Prevalência de *Klebsiella* spp. ESBL isolada em Hospital Escola do Sul de Minas Gerais. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v.12, n. 2, p. 497-506. 2014.

MATIAS, C.A.R.; PEREIRA, I.A.; ARAÚJO, M.S.; SANTOS, A.F.M.; LOPES, R.P.; CHRISTAKIS, S.; RODRIGUES, D.P.; SICILIANO, S. Characteristics of *Salmonella* spp. Isolated from Wild Birds Confiscated in Illegal Trade Markets, Rio de Janeiro, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-7. 2015.

MARTINS, A. C.; PICOLI, S. U. Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 421-426. 2011.

MYERS, J.P. et al. Conservation strategy for migratory species. **American Scientist**. v.75: 18-26, 1987.

MORRISON, R.G. Migration system of some new world shorebirds. In: J.BURGER & B.L.OLLA (Eds). Behavior of marine animais. p.125-202 Shorebirds: migration and fargins behavior. **New York Plenum Press**. v. 6, 743 p.1984.

OSTERBLAD, M, NORRDAHL, K, KORPIMÄKI, E, HUOVINEN, P. Antibiotic resistance. How wild are wild mammals. **Nature**. n. 9, v. 409, p. 37– 38. 2001.

PEREIRA, R.S., UENO, M. Presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos em formigas de ambiente hospitalar. **Revista Biociências**. v.19, n.2, p. 83-87. 2013.

PICCIRILLO, A.; MAZZARIOL, S.; CALIARI, D.; MENANDRO M.L. *Salmonella Typhimurium* Phage Type DT Infection in Two Moluccan Cockatoos (*Cacatua moluccensis*): Clinical Presentation and Pathology. **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 131–135, 2010.

RAMEY, A. M.; HERNANDEZ, J.; TYRLÖV, V.; UHER-KOCH, B. D.; SCHUMUTZ, J. A.; ATTEBY, C.; JÄRHULT, J. D.; BONNEDAHL, J. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Migratory Birds Inhabiting Remote Alaska. **EcoHealth**. v.15, n. 1, 2018.

RODRIGUES, R. C. **Aspectos sanitários, morfológicos, metabólicos e hormonais em aves migratórias (Charadriiformes) durante o período de invernada no Brasil**. 14p. 2015.

RICE, L. B.; BONOMO R. A. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J. JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. editors. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: ASM Press, p 1114-1145. 2003.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SIMBIEDA, J.L.; MILLER, W.A.; BYRNE, B.A; ZICCARDI, M.H.; ANDERSON, N.; CHOUICHA, N.; SANDROCK, C.E.; JOHNSON, C.K. Zoonotic pathogens isolated from wild animals and environmental samples at two California wildlife hospitals. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 238, n. 6, p.773-783. 2011.

STÜRENBERG, E.; MACK, D. Extended- spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology Laboratory, therapy, and infection control. **Journal of infection**. v. 47, n. 4, p. 273-295. 2003.

TAKEKAWA, J.Y.; IVERSON, A.K; SCHULTZ, N. J.; HILL, C. J.; CARDONA, W.M.; BOYCE, ; DUDDLEY, J.P. Field detection of avian influenza virus in wild birds. Evaluation of portable RT-PCR system and freeze-dried reagents. **Journal of Virological Methods**. v.166, p. 92-97. 2010.

TELINO-JÚNIOR, W. R.; AZEVEDO-JÚNIOR, S. M. & LYRA-NEVES, R.M. Censo de aves migratórias (Charadriidae, Scolopacidae e Laridae) na Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v 20, n. 3, p. 451-456. 2003.

TSIODRAS, S.; KELESIDIS, T.; KELESIDIS, I.; BANUCHINGER, U. and FLALAGAS, M. E. Human infections associated with wild birds. **Journal Infect**. v. 56; p. 83-98. 2008.

TUNCA, R., TOPLU, N., KURKAN, S., AVCI, H., AYDOGAN, A., EPIKMEN, E.T.; TEKBIKYIK, S. Pathomorphological, immunohistochemical and bacteriological findings in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) naturally infected with *S. Gallinarum*. **Avian Pathology**, v. 41, n. 2, p. 203-209, 2012.

THALLER, M. C.; MIGLIORE, L.; MARQUEZ, C.; TAPIA W, CEDEÑO, V.; ROSSOLINI, G. M.; GENTILE, G. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of Galapagos land iguanas: no man, no resistance. **PLoS ONE**. v.5, p.8989. 2010.

VIGO, G. B.; ORIGLIA, J.; GORNATTI, D.; PISCOPO, M.; SALVE, A.; CAFFER, M.I.; PICHEL, M.; BINSZTEIN, N.; LEOTTA, G .A. Isolation of *Salmonella Typhimurium* from dead blue and gold macaws (*Ara ararauna*). **Avian Diseases**, v.53, n.1, p.135-138, 2009.

WELLINGTON, E. M.; BOXALL, A. B.; CROSS, P., FEIL, E. J.; GAZE, W. H.; HAWKEY, P. M.; JOHNSON-ROLLINGS, A. S., JONES, D.L.; LEE, N. M., OTTEN, W.; THOMAS, C. M.; WILLIAMS, A. P.; The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. **Lancet Infectious Disease**. v.13, n. 2, p. 155–165. 2013.